Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

IMMUNOREGULATORISCHE AKTIVITÄTEN IN SEREN UND SYNOVIALFLÜSSIGKEITEN VON PATIENTEN MIT PRIMÄR–CHRONISCHER POLYARTHRITIS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

ANDREAS LOHRMANN
aus Kirchheim / Teck

1978

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

IMMUNOREGULATORISCHE AKTIVITÄTEN IN SEREN UND SYNOVIALFLÜSSIGKEITEN VON PATIENTEN MIT PRIMÄR–CHRONISCHER POLYARTHRITIS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

ANDREAS LOHRMANN
aus Kirchheim / Teck

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. H. - E. Hoffmeister
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. A. Berg
	(Professor Dr. H. D. Waller)
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. J. Gekeler

gedruckt bei Hans - Joachim Köhler , Reprografischer Betrieb , 74 Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
Einleitung		1
Patienten und Material		6
Methoden		8
I	Proteinbestimmung	8
II	Rheumafaktor-Bestimmung	8
III	Immunfluoreszenz	8
IV	Tuberkulin-Hauttest	8
V	Herstellung von Immunkomplexen	9
VI	Herstellung von aggregiertem Immunglobulin	9
VII	Herstellung von Synovialextrakt	9
VIII	Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test (LMIT)	10
	A. Direkter Test	10
	B. Indirekter Test	13
	C. Untersuchung von Serum und Synovialflüssigkeit auf Vorkommen von Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF)	15
	D. Bestimmung des Migrations-Inhibitions-Hemmfaktors (MIHF)	15
	E. Materialien für den LMIT	16
IX	Lymphozyten-Transformations-Test	17
X	Statistische Auswertung	18
Ergebnisse		19
I	Klinische Untersuchungen	19
	1. Alters- und Geschlechtsverteilung	19
	2. Klinische Stadieneinteilung	20
II	Serologische Untersuchungen	21
	1. Nachweis von Rheumafaktor	21
	2. Fluoreszenzserologischer Nachweis von Antikörpern	22
	a) gegen Gelenkkapselgewebe	22
	b) Nachweis organspezifischer und unspezifischer Antikörper	22
III	Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test (LMIT)	23
	1. Bestimmung der optimalen Präinkubationszeit	23

2. Einfluß von Immunkomplexen auf die Migration normaler Leukozyten 24

3. Leukozyten-Migrations-Inhibition, induziert mit Tuberkulin im direkten und indirekten Test an Tuberkulinpositiven und -negativen Versuchspersonen 26

4. Direkter Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test mit Leukozyten von Patienten mit PCP unter Verwendung von aggregiertem Immunglobulin und heterologem, homogenisiertem Synovialgewebe als Antigen 29

5. Untersuchung der Seren und Gelenkergüsse von PCP-Patienten auf Hemmaktivität mit Granulozyten gesunder Spender als Indikatorzellen 30

a) Untersuchung der Seren 30

b) Untersuchung der Synovialflüssigkeiten 31

6. Einfluß der Seren und Gelenkergüsse von Patienten mit PCP auf die spezifische, durch Tuberkulin induzierte Migrationshemmung 32

a) Untersuchung der Seren 32

b) Untersuchung der Synovialflüssigkeiten 35

IV Beeinflussung der Lymphozytentransformation durch Seren und Gelenkergüsse von Patienten mit PCP 36

a) Untersuchung der Seren 36

b) Untersuchung der Synovialflüssigkeiten 38

c) Vergleich zwischen Serum-Hemmfaktor (SIF) und Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor (MIHF) 40

Diskussion 42

Zusammenfassung 52

Literaturverzeichnis 54

ABKÜRZUNGEN

DNS	Desoxyribonucleinsäure
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
IRA	Immunoregulatorisches Alpha-Protein
KLH	keyhole limpet hemocyanin (Farbstoff der Napfschnecke)
LIF	Leukozyten-Inhibitions-Faktor
LMIT	Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test
LTT	Lymphozyten-Transformations-Test
MI	Migrationsindex
MIF	Migrations-Inhibitions-Faktor
MIHF	Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor
PCP	primär-chronische Polyarthritis
PHA	Phytohämagglutinin
PPD	purified protein-derivate (= Tuberkulin "GT")
SIF	serum inhibitory factor (= Serum-Hemmfaktor)
T-Zelle	Thymus-abhängiger Lymphozyt

Die vorliegende Arbeit entstand von September 1975 bis Juni 1977 an der von Prof. Dr. H. D. Waller geleiteten Abteilung II der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. A. Berg.

Für die Überlassung des Themas, für die Hilfe und den Rat, mit der er mich bei der Durchführung der Arbeit unterstüzte, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Sachmittel möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Berg herzlich bedanken.

Herr Priv.Doz. Dr. G. König, Oberarzt der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen, beriet mich bei der Auswahl der Patienten und stellte mir den Großteil der Gelenkergüsse und Gewebeproben zur Verfügung.

Frau Dr. Goethe, die die rheumatologische Nachsorgeambulanz in der Med. Universitätsklinik betreute, unterstützte mich ebenfalls bei der Sammlung von Seren und Gelenkergüssen.

Herr Prof. Dr. W. Ax von den Behringwerken führte mich in die Methode des Migrations-Inhibitions-Testes ein.

Ihnen allen, sowie den Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors von Prof. Dr. Berg, insbesondere Herrn Dr. N. Brattig, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

EINLEITUNG

Die Ursache der primär-chronischen Polyarthritis (PCP), im angloamerikanischen Schrifttum auch rheumatoide Arthritis genannt, ist unbekannt. Zwar werden Virus- und Mykoplasmeninfektionen als mögliche ätiologische Faktoren diskutiert, doch bisher ist es noch nicht gelungen, die infektiöse Genese dieser Erkrankung zu beweisen (Übersicht:20).

Dagegen sprechen zahlreiche humorale und zellvermittelte Immunphänomene dafür, daß bei der primär-chronischen Polyarthritis vor allem immunologische Faktoren eine Rolle spielen, die wahrscheinlich auch die Ursache der Chronizität sind.

Eine Vielzahl von Auto-Antikörpern, von denen der klassische Rheumafaktor nur einer unter vielen ist, konnte bisher im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit PCP nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist jedoch das Auftreten dieser Auto-Antikörper bei der rheumatoiden Arthritis nur ein sekundäres Phänomen, sind sie doch meist erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien festzustellen, und auch dann nicht in jedem Fall. Außerdem liegen Berichte vor von Patienten, die trotz Agammaglobulinämie eine rheumatoide Arthritis entwickelten (6,11,24).

In den letzten Jahren verlagerte sich das Interesse auf die Untersuchung der Beteiligung zellvermittelter Immunreaktionen an der Pathogenese der PCP, obwohl diesbezügliche Hinweise schon seit längerem bekannt sind. Dafür sprechen z.B.das Auftreten dichter Lymphozyteninfiltrationen in der Synovialmembran der befallenen Gelenke (81), das konstante Vorkommen von Lymphozyten im Erguß, aber auch die relative Anergie, die bei dieser Krankheit besteht und durch Hautteste mit verschiedenen Antigenen verifiziert werden kann (22,74,76,31,1).

Neben diesen klinischen Befunden gibt es heute In-vitro-Methoden, die den Nachweis einer zellvermittelten Immunreaktion erlauben. Dazu gehören der Lymphozyten-Transformations-Test (LTT), bei dem die Teilungsrate sensibilisierter Lym-

phozyten in Gegenwart von Antigen gemessen wird, sowie der Migrations-Inhibitions-Test, bei dem sensibilisierte Lymphozyten durch Kontakt mit dem Antigen einen Faktor freisetzen, der die Wanderung von Makrophagen und Leukozyten aus Kapillaren oder unter Agarose hemmt. ROCKLIN konnte allerdings durch Gel-Filtration nachweisen, daß es sich dabei um 2 verschiedene Faktoren handelt: einen, der auf Monozyten und Meerschweinchen-Peritoneal-Makrophagen wirkt (Migrations-Inhibitions-Faktor, MIF, MG = 23 000), und einen anderen, der polymorphkernige neutrophile Granulozyten hemmt (Leukozyten-Inhibitions-Faktor, LIF, MG = 69 000)(54). Da beide unter denselben Bedingungen gebildet werden und gleiche Wirkung zeigen, können sie identisch interpretiert werden.

Die Sensibilität dieser Testsysteme hängt jedoch wesentlich von dem verwandten Antigen ab. Die oben erwähnte lymphozytäre Infiltration der Synovialmembran läßt vermuten, daß dort lokalisierte Antigene die Immunstimulation unterhalten. So konnte SCHEIFFARTH mit Gelenkextrakten als Antigen eine erhöhte Teilungsrate der Lymphozyten messen (62). Allerdings scheint dies nur dann der Fall zu sein, wenn die Gelenke von Rheumatikern stammten, denn ROTHENBERGER und THIELE konnten diese Befunde mit arthrotisch veränderten Gelenken nicht bestätigen (59). Widersprüchliche Ergebnisse mit Synovialgewebe als Antigen liegen uns bei Anwendung des Migrations-Inhibitions-Testes vor (60,4,45).

Mit aggregiertem Immunglobulin als Antigen konnte ROTHENBERGER (58), FRÖLAND undGAARDER (23), BROSTOFF et al. (10) und ZITNAN et al. (80) eine Migrationshemmung feststellen.

Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen, die zeigen konnten, daß Mitogen- und Antigeninduzierte Faktoren in der Synovialflüssigkeit bereits gebildet vorliegen. So konnten STASTNY et al. das Vorkommen eines MIF im rheumatischen Gelenkerguß nachweisen (68), STIEHL et al. gelang dies auch für den LIF (70).

Über die Ursache der relativen Anergie von PCP-Patienten gibt es bislang nur Vermutungen. Ein möglicher Grund könnte

in quantitativen oder qualitativen Abweichungen einzelner Lymphozytensubpopulationen liegen.

Die Lymphozyten im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Rheumatikern sind deshalb wiederholt auf ihren T- und B-Zellen-Anteil hin untersucht worden. Während KEITH und CURREY (33), SHELDON et al. (63), MICHELI und BRON (43) und BRENNER et al. (9) über eine normale T/B-Zell-Relation berichteten, stellten PAPAMICHAIL et al. (50), WILLIAMS et al. (79) und POPOVIC et al. (52) einen relativen T-Zellen-Mangel fest, vor allem bei den schwereren Verläufen. UTSINGER berichtete außerdem über eine absolute Lymphopenie bei PCP-Patienten (75).

Über das Verhalten von Rheumatiker-Lymphozyten bei Stimulation mit den pflanzlichen Mitogenen Phytohämagglutinin (PHA), Concovalin A (Con A) und pokeweed mitogen (PWM) liegen ebenfalls zahlreiche Berichte vor, die sich folgendermaßen zusammenfassen lassen können: Bei Stimulation mit den vorwiegend auf T-Lymphozyten wirkenden Mitogenen PHA und Con A (29) hatten die Lymphozyten von Rheumatikern, verglichen mit Kontroll-Lymphozyten eine verminderte Zellteilungsrate, während bei Stimulation mit dem B-Zell-Mitogen PWM keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe festzustellen waren (76,36,38,64).

In der gemischten Lymphozytenkultur (mixed lymphocyte culture, MLC) konnten ASTORGA und WILLIAMS (2), HEDBERG et al. (25) und RAWSON und HUANG (53) eine verminderte Teilungsfähigkeit feststellen, wenn beide Lymphozytenpopulationen von Rheumatikern stammten, während CAPERTON et al. diese Befunde nicht bestätigen konnten (13).

Eine andere Ursache der Anergie könnten humorale Faktoren sein, Lymphokine oder Serumfaktoren anderen Ursprungs, die die Funktionen der Lymphozyten regulieren. So konnte KANTOR im Tierversuch zeigen, daß die bei einer Virusinfektion vorübergehend auftretende Anergie durch Serumfaktoren und nicht durch Zellen unterhalten wird (32). Gleiche oder ähnliche Faktoren, wahrscheinlich Hemmfaktoren der DNS-Synthese, wurden bei einer Reihe von Infektionskrankheiten,

aber auch bei Tumor- und Autoimmunerkrankungen und während der Schwangerschaft gefunden (8,27,35,37,40,41,46,71,72,77), und man nimmt an, daß sie ein Reaktionsprodukt der Lymphozyten bei Kontakt mit dem Antigen sind. Insofern können diese Faktoren einen indirekten Hinweis darstellen für die Immunpathogenese einer Erkrankung.

Im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis ist über solche Faktoren noch wenig bekannt. WILLIAMS et al. (78) und KEYSTONE et al. (34) konnten allerdings zeigen, daß bei der oben erwähnten verminderten Reaktion in der MLC auch Serumfaktoren eine Rolle spielen müssen.

Für unsere Untersuchungen über die Migrations-Inhibition verwandten wir anstatt der Kapillarenmethode ein neues, einfacheres Testsystem, den sog. " LIF-Agarose-Assay " nach CLAUSEN (15), bei dem die Wanderung von menschlichen Leukozyten unter Agarose gemessen wird. Uns interessierte die Frage, ob bei Patienten mit PCP mit dieser Technik eine zellvermittelte Immunreaktion gegenüber aggregiertem Immunglobulin und heterologem Synovialgewebe nachgewiesen werden kann. Des weiteren wollten wir wissen, ob mit unserer Technik der Nachweis von Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) in Serum und Synovialflüssigkeit möglich ist. Durch einen Vorversuch sollte außerdem geklärt werden, welchen unspezifischen Einfluß Immunkomplexe auf die Migration normaler Leukozyten ausüben.

Der zweite Hauptteil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis von immunsuppressiven Faktoren im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Dazu wurde die Mitoserate unspezifisch stimulierter, normaler Lymphozyten in Gegenwart von Rheumatiker-Serum bzw. -Synovialflüssigkeit gemessen und mit der Wirkung eines Kontrollserums bzw. -ergusses verglichen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob diese Faktoren auch die spezifische Immunantwort zu unterdrücken in der Lage sind. Dazu wurde der " LIF-Agarose-Assay " eingesetzt. Zunächst wurde mit Tuberkulin als Antigen eine spezifische Migrationsinhibition hervorgerufen. In Parallel-

versuchen wurde bestimmt, wieweit diese Tuberkulininduzierte Migrationsinhibition unter dem Einfluß von Rheumaserum und -synovialflüssigkeit wieder aufgehoben wurde.

PATIENTEN und MATERIAL

Patienten

Zusammensetzung des Patientenguts: Das Patientengut bestand aus insgesamt 220 Patienten, davon 115 mit gesicherter bzw. klassischer PCP. Weitere Aufschlüsselung der Diagnosen, sowie die Verteilung des Untersuchungsmaterials auf die einzelnen Gruppen siehe Tab. 1.

Diagnosen	Anzahl der			
	Patienten	Gewebeproben	Syn.flüss.	Seren
Rheumatoide Arthritis				
-mögliche	27	5	11	46
-wahrscheinliche	24	4	4	30
-gesicherte	90	39	24	119
-klassische	25	15	10	20
Arthrosen	16	4	14	5
M.Bechterew	7	1	1	9
Meniskopathien	5	2	5	1
Sonstige	9	4	6	4
Arthropathien unklarer Genese	16	2	10	10

Tab. 1: Zusammensetzung der Patienten und des Untersuchungsmaterials.

Kontrollseren stammten zumeist von gesundem Klinikpersonal, als Kontrollsynovialflüssigkeiten wurden Reizergüsse von Patienten mit Arthrosen und Meniskopathien angesehen.

Herkunft: Der größte Teil der Patienten wurde von der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen betreut. Ein Teil der Patienten wurde stationär in der Medizinischen Klinik Tübingen behandelt. Nach der Entlassung erfolgte die Weiterbetreuung in der rheumatologischen Nachsorgeambulanz.

Diagnose und Klassifikation: Die Diagnose stützte sich auf die von der American Rheumatism Association (ARA) geforderten Kriterien (56): morgendliche Steifigkeit der kleinen Fingergelenke, Bewegungs- oder Druckschmerz in mindestens einem Gelenk, Schwellung oder Erguß eines weiteren Gelenks,

bilaterale, symmetrische Schwellung der kleinen Gelenke über mindestens 6 Wochen, subkutane Knoten, typische Röntgenbefunde, Nachweis von Rheumafaktor, schwaches Muzinpräzipitat der Synovialflüssigkeit, charakteristische Veränderungen der Synovialmembran und der subkutanen Knoten. Je nach Anzahl der Symptome wird unterschieden zwischen einer möglichen, wahrscheinlichen, gesicherten und klassischen rheumatoiden Arthritis. Sämtliches untersuchte Material stammte von Patienten mit gesicherter bzw. klassischer rheumatoider Arthritis.

Die klinische Stadieneinteilung basierte auf der Einteilung nach STEINBROCKER (69).

Aktivitätsgradeinteilung: Die Beurteilung der klinischen Aktivität erfolgte nach Kriterien, die von OTTO et al. aufgeführt wurden (48): Dauer der Morgensteifigkeit der kleinen Gelenke, lokale Überwärmung des Gelenks, Ausmaß der Gelenkschwellung, alpha-2-Globulinerhöhung, Blutsenkungsgeschwindigkeit, C-reaktives Protein. Danach wird unterschieden zwischen keiner (0), einer leichten (1), mäßigen (2) oder hohen Aktivität (3).

Material

Seren: Zentrifugation bei 2 000 U/min, Aufbewahrung der Seren in Aliquots bis zum Verbrauch bei -20°C.

Synovialflüssigkeiten: Gewinnung intraoperativ oder durch Gelenkpunktion unter Zugabe von 10 E Heparin/ml. Zellen und Detritus wurden durch Zentrifugation bei 2 000 U/min entfernt. Aufbewahrung in Aliquots bis zum Verbrauch bei -20°C.

Sterilisierung: Für die Testung in Zellkulturen wurden Seren und Synovialflüssigkeiten durch Filtration (Millipore Einmalfilter, Porengröße 45 µm) sterilisiert und anschließend dekomplementiert (30 min Erwärmung auf 56°C).

Gewebe: Die intraoperativ gewonnenen Gewebeproben wurden sofort in -70°C kaltem Isopentan schnellgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

METHODEN

I. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von LOWRY et al. angegebenen Methode (39) mit Reagenzien von Merck, Darmstadt. Als Eichkurve diente eine Verdünnungsreihe aus kristallinem Rinderserumalbumin (Behringwerke AG). Die Extinktion wurde mit dem Beckman Spektralphotometer DB-GT gemessen.

II. Rheumafaktor-Bestimmung

Der qualitative Nachweis des IgM-Rheumafaktors erfolgte mit dem Latex-Tropfentest nach der vom Reagenzienhersteller (Hyland Lab.,Kalifornien) gelieferten Anleitung.

III. Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzoptische Studien wurden an ca. 6 µm dicken Gefrierschnitten aus homologer und heterologer (Rinder-) Synovialmembran, menschlicher Schilddrüse und Niere, sowie Magen, Leber und Niere von der Ratte durchgeführt. Nach Überschichten mit Serum bzw. Synovialflüssigkeit (Verdünnung 1:15) und anschließendem Waschen mit Coons-Puffer (pH=7,2) erfolgte die Überschichtung mit Fluoreszein-markierten Antisera von der Ziege (Hyland Lab., Kalifornien), Verdünnung 1:10. Näheres s. ROITT und DONIACH (55).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Leitz-Universal-auflichtmikroskopes Orthoplan, Sperrfilter S 525, Erregerfilter KP 500 und BG 38.

IV. Tuberkulin-Hauttest

Die in-vivo-Testung der Immunitätslage gegenüber Tuberkulin erfolgte mit dem Tubergen^{R}-Teststempel (Behringwerke AG) in der vom Hersteller angegebenen Art und Weise. Als positiv wurden Reaktionen gewertet, die eine Induration von 1-2 mm Durchmesser zeigten.

V. Herstellung von Immunkomplexen

Die Präparation von Immunkomplexen erfolgte mittels der Immunpräzipitationsreaktion, die von HEIDELBERGER und KENDALL beschrieben wurde (26). Kristallines Humanalbumin, trocken, reinst (Behringwerke AG) wurde in steriler, phosphatgepufferter Saline (pH=7,2) gelöst und davon eine Verdünnungsreihe hergestellt, die von 62 µg bis 2 000 µg Albumin/ml reichte. Von jeder Konzentration wurden 0,5 ml mit 0,5 ml Anti-Albumin-Serum vom Kaninchen (Behringwerke AG) gemischt, 1 Stunde lang bei 37°C und anschließend 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Dieses Reaktionsgemisch wurde dann im Migrationstest untersucht.

Zur Berechnung der Immunpräzipitationskurve wurden 0,5 ml des Antigen-Antikörper-Gemisches 45 min lang bei 2 000 U/min zentrifugiert, dreimal mit eiskalter Saline gewaschen, das Präzipitat in 1 ml 0,1-n-NaOH gelöst und dessen Eiweißgehalt bestimmt.

VI. Herstellung vom aggregiertem Immunglobulin

Aggregiertes Immunglobulin wurde nach BROSTOFF et al. (10) in modifizierter Form hergestellt. Beriglobin^{R} (Behringwerke AG) wurde 12 min lang in einem 63°C heißen Wasserbad erhitzt und anschließend 30 min mit 20 000 g zentrifugiert (Sorvall Superspeed RC 2-B, Rotor SS 34), um die größeren Aggregate zu entfernen. Nach Messung der Proteinkonzentration im Überstand mit der LOWRY-Methode erfolgte die Einstellung auf Konzentrationen von 100, 1 000 und 10 000 µg/ml mit HEPES-gepuffertem Eagles Dulbecco's Medium.

VII. Herstellung von Synovialextrakt

Die Präparation folgte weitgehend der von ROTHENBERGER und THIELE beschriebenen Methode (59). Synovialgewebe wurde bei Zimmertemperatur zum Auftauen gebracht und sorgfältig von Fett und Knorpel befreit. Dann wurde das Gewebe im fünffachen Volumen bikarbonatgepufferter Hank's Lösung (pH=7,2) aufgenommen und im Potter-Elvehjem-Homogenisator 10 min lang

mit 1 500 U/min zerstückelt. Eine weitere Zerstörung der Zellen wurde durch dreimaliges rasches Einfrieren und Wiederauftauen erreicht. Um größere Gewebebestandteile zu entfernen, wurde das Homogenat nochmals 10 min lang bei 5 000 g zentrifugiert. Für die Kulturen wurden die Überstände in Konzentrationen von 100 und 200 µg/ml Medium verwandt.

VIII. Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test

Es kam die sogenannte "CLAUSEN-Technik" (15) in der Modifikation nach AX und TAUTZ (3) mit eigenen Variationen zur Anwendung.

A. Direkter Test

1.Herstellen der Zellsuspension

Abnahme von heparinisiertem (50 E/ml) Venenblut. Anfertigen eines Differentialblutbildes nach PAPPENHEIM. Danach wurde das Blut mit 5% Dextran 250-Lösung (in Hank's Lösung) im Verhältnis 4 Teile Blut : 1 Teil Dextran-Lösung gemischt und 1 Stunde lang bei 37°C stehen gelassen. Abheben des leukozytenreichen Überstandes und dreimalige Waschung mit bikarbonatgepufferter Hank's Lösung (pH=7,4). Zentrifugation jeweils 7 min mit 200 g. Die Einstellung auf die Konzentration von $0{,}25 \cdot 10^9$ polymorphkernige Granulozyten/ml erfolgte mit HEPES-gepuffertem Eagles Dulbecco's Medium (+ Glutamin, + 100 E Penicillin/ml, + 100 µg Streptomycin/ml, + 1,8 g Polyvinylpyrrolidon/100 ml, + 10 E Heparin/ml, pH=7,4).

2. Herstellen der Agarose-Petrischalen

1,2 g Agarose wurden in 45 ml sterilem Aqua bidestillata durch kurzes Aufkochen gelöst und wieder auf 45°C abgekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von 45 ml, auf dieselbe Temperatur vorgewärmtem, doppelt konzentriertem, HEPES-gepuffertem Eagles Dulbecco's Medium und 10 ml autologem Plasma. Das fertige Medium enthielt 1,2% Agarose, 10% autologes Plasma, 2 mM Glutamin, 25 mM HEPES, 100 E Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und 2-n-NaOH, bis pH=7,4. Nach gründlicher

Durchmischung wurden in jede Petrischale (Durchmesser 6 cm) 5 ml gegossen. Nachdem die Agarose starr war, wurden in jede Petrischale 8 Löcher mit einem Durchmesser von 2,5 mm gestanzt.

3. Inkubation

25 µl der Zellsuspension wurden mit 25 µl der Antigen- bzw. Kontrollösung in Mikrotiterplatten gut vermischt. Nach zweistündiger Vorinkubation bei 37°C in 5% CO_2-Atmosphäre (Forma Scientific Inkubator, Ohio USA, Modell 3156) wurden von jeder Suspension 4 Zellportionen à 10 µl in die Agaroselöcher eingefüllt, so daß Test- und Kontrollansatz immer auf dieselbe Petrischale kamen und 18 Stunden bei 37°C in 5% CO_2-Atmosphäre inkubiert.

Sämtliche Arbeiten unter 1.-3. wurden unter sterilen Bedingungen in einem "laminar-air-flow"-Gerät (Ceag Schirp Reinraumtechnik, Bork/Westfalen) durchgeführt.

4. Auswertung

Nach Fixierung mit absolutem Methanol (10 min) und 40% Formalin (40 min) ließ sich die Agarose gut vom Boden der Petrischalen entfernen, ohne die am Boden haftenden Zellen zu beschädigen. Anfärben der Zellen nach PAPPENHEIM. Projektion der Schalen mit einem gewöhnlichen Dia-Gerät, Abzeichnen der Migrationshöfe auf Papier und Wiegen der Papierscheiben auf einer Präzisionswaage (Mettler H 20 T).

Der Migrationsindex wurde nach der Formel:

$$MI = \frac{M_x}{M_o}$$

bestimmt. Dabei entspricht M_x dem mittleren Flächeninhalt der 4 Migrationshöfe mit Zusatz von Antigen, bzw. M_o dem mittleren Flächeninhalt der 4 Migrationshöfe ohne Zusatz von Antigen.

Eine eindeutige Migrationsinhibition und damit das Vorliegen einer zellvermittelten Immunreaktion liegt bei einem Migrationsindex von weniger als 0,8 vor.

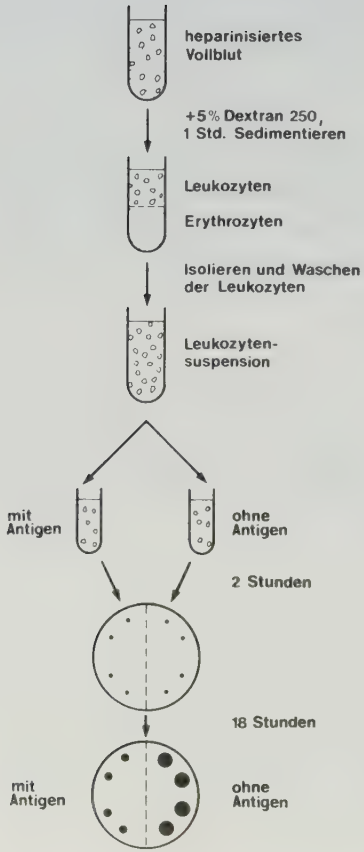


Abb. 1: schematische Darstellung des direkten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Testes (LMIT).

B. Indirekter Test

1. Gewinnung von LIF-haltigen Überständen

Ca. 15 ml Lymphoprep^{R} mit einer spezifischen Dichte von d = 1,077 wurden vorsichtig mit heparinisiertem Venenblut überschichtet. Durch 40minütige Zentrifugation bei 800 g wurden die Lymphozyten von den übrigen Blutbestandteilen abgetrennt. Nach dreimaliger Waschung mit je 50 ml Hank's Lösung (Zentrifugation jeweils 10 min bei 700 g) erfolgte die Suspension in HEPES-gepuffertem TC-199-Medium (+ 20% Pferdeserum, + 100 E Penicillin/ml, + 100 µg Streptomycin/ml), so daß die endgültige Konzentration in der Kultur bei $2 \cdot 10^6$ Lymphozyten/ml lag. Danach wurde das Antigen in der jeweiligen Konzentration bzw. der Leerwert zugegeben. Die Kultur erfolgte in Volumina zu 0,5 ml in Polypropylen-Röhrchen. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C in 5% CO_2-Atmosphäre wurden die Röhrchen 15 min lang bei 2 000 g zentrifugiert, um so die Überstände zu gewinnen. Den Leerwerten wurde nun dieselbe Antigenmenge beigefügt, so daß jetzt die Antigenkonzentration in den stimulierten und in den Kontrollüberständen gleich groß war.

2. Herstellen der Leukozytensuspension

Hierbei mußten die Leukozyten von einer zweiten, gesunden Person gewonnen werden, die gegen das getestete Antigen nicht sensibilisiert sein durfte.

3. Testung der Überstände auf LIF-Aktivität

Je 25 µl Überstand und Leukozytensuspension (Endkonzentration $1 \cdot 10^8$ Granulozyten/ml) wurden gut vermischt und 2 Stunden lang im CO_2-Schrank vorinkubiert. Das weitere Vorgehen (Herstellen der Agaroseschalen, Einfüllen der Zellen, Auswertung) erfolgte wie beim direkten Test.

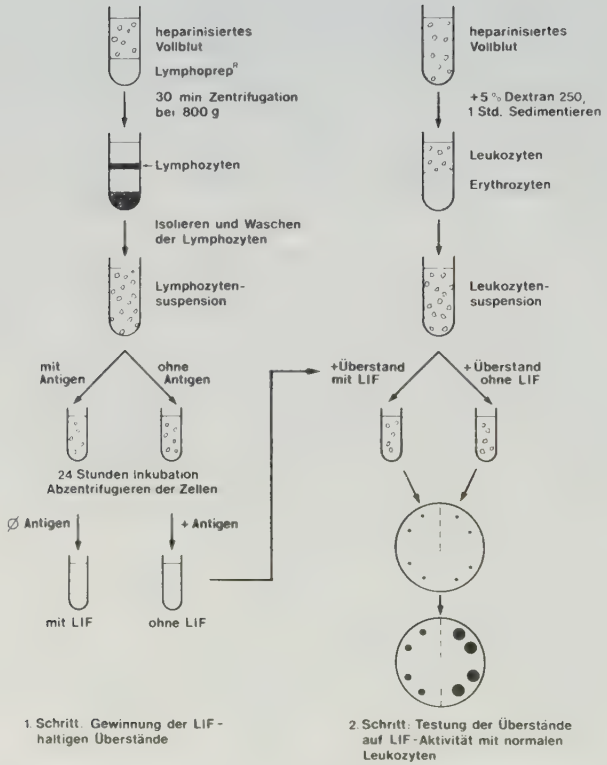


Abb. 2: schematische Darstellung des indirekten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Testes (LMIT).

C. Untersuchung von Serum und Synovialflüssigkeit auf Vorkommen von Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF)

Mit den Granulozyten von 2 gesunden Zellspendern wurde eine Zellsuspension hergestellt, wie es bereits beim direkten LMIT beschrieben wurde und mit dem zu untersuchenden Serum bzw. der zu untersuchenden Synovialflüssigkeit (beide dekomplementiert) vermengt. Die Zellkonzentration betrug gegenüber dem direkten Test $1 \cdot 10^8$ Granulozyten/ml Medium. Nach 2stündiger Vorinkubation bei 37°C in 5% CO_2-Atmosphäre wurden 10 µl-Zellportionen in die Löcher der Agaroseschalen übertragen; weiteres siehe direkter LMIT.

Die Bezugsgröße für den Migrationsindex bildete der Mittelwert dreier Kontrollseren (autologes Serum, kommerzielles AB-Serum, homologes Serum) bzw. der von Patienten mit Arthrose gewonnenen Synovialflüssigkeiten. Der Migrationsindex für ein Serum bzw. eine Synovialflüssigkeit berechnete sich nach der Formel:

$$MI = \frac{\text{mittl. Flächeninhalt des Testserums bzw. -ergusses}}{\text{mittl. Flächeninhalt aller Kontrollsera bzw. -ergüsse}}$$

D. Bestimmung des Migrations-Inhibitions-Hemmfaktors (MIHF)

Um den Einfluß der Rheumaseren bzw. -ergüsse auf die Migrationsinhibition zu untersuchen, wurde folgendes Verfahren angewandt:

Die Leukozyten von 2 gesunden, Tuberkulinpositiven Zellspendern wurden mit Tuberkulin (Tuberkulin "GT", Behringwerke AG) inkubiert, wie es bereits beim direkten LMIT beschrieben wurde, um eine spezifische Migrationsinhibition zu erreichen. Diesem Testsystem war parallel Serum oder Synovialflüssigkeit (dekomplementiert) zugesetzt worden, so daß die Endkonzentration in der Kultur bei 100 µg Tuberkulin/ml, 40% Serum oder Synovialflüssigkeit (bzw. als Leerwert Medium) und $1 \cdot 10^8$ Granulozyten/ml Medium lag. Alles weitere (Vorinkubation, Herstellung der Agaroseschalen, Inkubation) erfolgte wie beim direkten LMIT.

Auswertung: Die Berechnung des MIHF ergab sich aus der Formel:

$$MIHF = \frac{1}{1-MI_{Tb}} \cdot (1-MI_{Tb+Sr})$$

Dabei ist MI_{Tb} der Migrationsindex aus dem Quotient der Migrationshöfe mit und ohne Tuberkulin und MI_{Tb+Sr} der Migrationsindex aus dem Quotient der Migrationshöfe mit Tuberkulin + Serum (bzw. + Synovialflüssigkeit) mit den Migrationshöfen, bei denen nur Serum zugegeben wurde.

Wurde die spezifische Migrationsinhibition durch das zugegebene Serum bzw. Synovialflüssigkeit überhaupt nicht beeinflußt, so beträgt der MIHF nach dieser Formel = 1, bei völliger Aufhebung der Migrationsinhibition beträgt der MIHF = 0.

Um den Einfluß der Rheumaseren und -ergüsse auf die Wirkung von LIF zu untersuchen, wurde folgender Weg beschritten: Überstände, die LIF enthalten, wurden durch Stimulation der Lymphozyten Tuberkulinpositiver Zellspender gewonnen (s. Meth.VIII.B.1.). Diesen Überständen wurden Kontrollseren (-ergüsse) und Rheumaseren (-ergüsse) zugegeben, so daß deren Konzentration in der Kultur 40% betrug. In einem 2. Schritt wurde untersucht, ob und inwieweit die Zugabe der Seren die Wirkung von LIF an Granulozyten Tuberkulinnegativer Zellspender aufhob.

E. Materialien für den LMIT

- Liquemin 25 000 (Roche)
- Dextran 200 (Serva Nr. 18 694)
- Hank's balanced salt solution 10fach konz.(Flow Cat. Nr.3-022 M)
- TC Bicarbonate 10% (Difco 5788-59)
- Eagles Dulbecco's Medium 10fach konz.(Flow Cat.Nr. 1-002 M)
- L-Glutamine 200 mM (Flow Cat.Nr.6-134 B)
- Agarose (Serva 11 397)
- Polyvinylpyrrolidon (PVP) (Merck Art.7443)
- TC Penicillin-Streptomycin (Difco 5854-59)

- HEPES (Serva 25 245)
- Lymphoprep^{R} (Nyegaard & Co, Oslo)
- TC 199-Medium (+ 20 mM HEPES, + Glutamine, ohne Bikarbonat) (Flow Cat.Nr.1-049 M)
- Petrischalen für Gewebekulturen (Greiner, Nürtingen, Best.-Nr.TC 60/15)
- Reagenzröhrchen aus Polypropylen (PPN) (Greiner, Nürtingen, Best.-Nr.12/75)
- Mikrotiterplatten, System Cooke (Greiner, Nürtingen)

IX. Lymphozyten-Transformations-Test

Die Methode ist eine Modifikation des von PENHALE et al. beschriebenen Lymphozyten-Tranformations-Testes (51). Jeder Test wurde parallel mit den Lymphozyten von 2 gesunden Zellspendern durchgeführt.

Die Lymphozytenisolierung aus heparinisiertem Vollblut wurde bereits beim indirekten LMIT beschrieben. Nach dreimaliger Waschung der Lymphozyten mit je 50 ml bikarbonatgepufferter Hank's Lösung erfolgte die Aufnahme in HEPES-gepuffertem TC 199-Medium (+ 100 E Penicillin/ml, + 100 µg Streptomycin/ml), Auszählung in Trypanblau und Einstellung auf die berechnete Konzentration. Zugabe des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) (Difco Detroit/USA),in Saline gelöst, und von Test- bzw. Kontrollserum, sowie autologem Plasma. Eine Kultur enthielt $0{,}2 \cdot 10^{6}$ Lymphozyten in 0,2 ml Kulturmedium. Die Endkonzentrationen betrugen 10 µg PHA/ml, 10% autologes Plasma und 20% Testserum bzw. -synovialflüssigkeit.

Die Lymphozytenkulturen erfolgten auf Mikrotiterplatten, System Cooke (Greiner, Nürtingen). Für jedes Serum wurden 3 Kulturen angesetzt.

Nach gründlicher Durchmischung wurden die Platten 48 Stunden lang bei 37°C in 5% CO_2-Atmosphäre inkubiert. 6 Std. vor Ende der Inkubationszeit wurden die Kulturen mit 20 µl ^{3}H-Thymidin-Lösung (Amersham Buchler) beimpft, so daß die Radioaktivität 1 µCi/ml betrug.

Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturen mit dem halbautomatischen System "Cell Harvester" (Scatron, Lierbyen/Nor-

wegen) vom Kulturmedium abgetrennt. Die Filterplättchen wurden dann in Zählfläschchen (Zinsser, Frankfurt) gelegt und getrocknet. Anschließend wurde in jedes Fläschchen 5 ml Szintillatorgemisch, bestehend aus 42 ml Liquifluor^{R} (New England Nuclear, Boston/USA) und 1 l Toluol (Merck, Darmstadt) eingefüllt. Die Strahlung wurde 2 min lang im Szintillationszähler Isocap 300 (Searle, Nuclear Chicago) gemessen und in Zählimpulsen pro Minute (cpm) ausgedruckt.

Für jedes Serum wurde aus den 3 Bestimmungen der Mittelwert berechnet. Als Standard wurde der Mittelwert von 3 mitgetesteten Seren gesunder Kontrollpersonen verwendet. Der Serum-Hemmfaktor (serum inhibitory factor, SIF) errechnete sich aus der Formel:

$$SIF = \frac{\text{x cpm der stimul.Lymphozyten + Testserum}}{\text{x cpm der stimul.Lymphozyten + Kontr.serum}}$$

X. Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden nach dem t-Test für ungepaarte Stichproben mit einem Tischcomputer (Hewlett Packard 9810 A Calculator) durchgeführt.

ERGEBNISSE

I. Klinische Untersuchungen

1. Alters- und Geschlechtsverteilung

Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten ist Abb. 3 zu entnehmen.

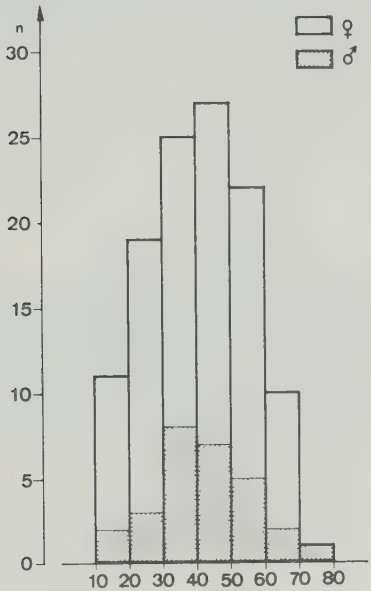


Abb. 3: Alters- und Geschlechtsverteilung von 115 Patienten mit gesicherter und klassischer PCP bei Diagnosestellung.

Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung lag bei 40 Jahren, der jüngste Patient war 11, der älteste 73 Jahre alt.

Die Abbildung zeigt deutlich das bevorzugte Auftreten einer PCP vom 30. bis 50. Lebensjahr.Andererseits erkennt man, daß sich eine rheumatoide Arthritis bereits im 2. und 3. Lebensjahrzehnt manifestieren kann. Ferner zeigt sich ein Überwiegen des weiblichen Geschlechtes,wobei sich das Verhältnis wie 88 : 27 verhielt.

2. Klinische Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung der Patienten erfolgte nach STEINBROCKER (69). Das Ergebnis bei 115 Patienten ist Tab. 2 zu entnehmen.

Klinisches Stadium	Anzahl der Patienten	relative Häufigkeit
Stadium 1	18	15,5%
Stadium 2	44	39 %
Stadium 3	47	40,5%
Stadium 4	6	5 %

Tab. 2: Klinische Stadien bei 115 Patienten mit PCP.

Bei 18 Patienten (= 15,5%) lag das Stadium I vor, das heißt, hierbei fehlen noch röntgenologische Veränderungen, Muskelatrophien, Gelenkdeformationen und extraartikuläre Veränderungen. 44 Patienten (= 39%) gehörtem zum Stadium II, das durch die typische bandförmige, gelenknahe Osteoporose und mäßig stark ausgeprägte Muskelatrophien charakterisiert ist. 47 Patienten (= 40,5%) befanden sich im Stadium III, bei dem zusätzlich Knorpel- und Knochendestruktionen, sowie Fehlstellungen der Gelenke imponieren. Das Stadium IV, das durch knöcherne Ankylosen gekennzeichnet ist, kam bei den 115 Patienten nur 6 mal (= 5%) vor.

II. Serologische Untersuchungen

1. Nachweis von Rheumafaktor

Der qualitative Nachweis des Rheumafaktors erfolgte mit dem Latex-Tropfen-Test (Fa. Hyland).

Die Häufigkeit des Auftretens des Rheumafaktors bei den einzelnen Krankheitsstadien gibt Abb. 4 wieder. Bei 2 Patienten trat während des Beobachtungszeitraums der Rheumafaktor neu auf; bei nur einem Patienten wurde unter der Behandlung der Rheumafaktor wieder negativ.

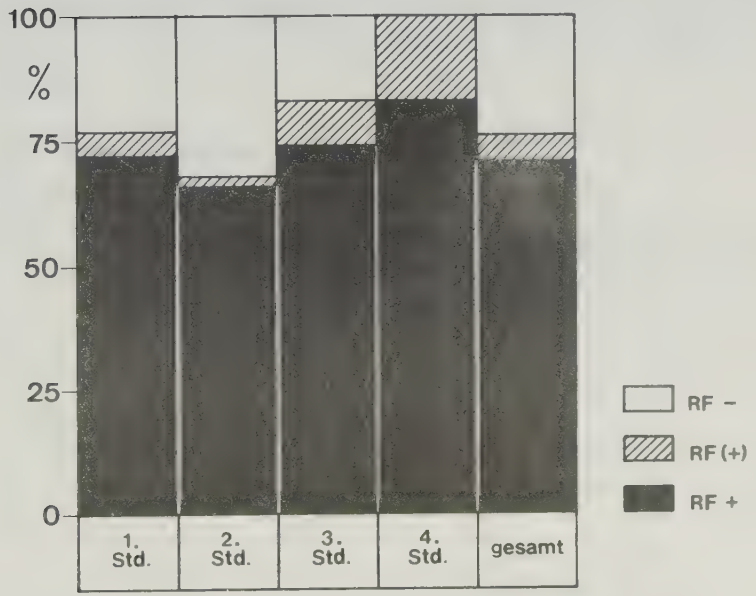


Abb. 4: Prozentuale Häufigkeit von seronegativer PCP und seropositiver PCP bei den einzelnen klinischen Stadien.

2. Fluoreszenzserologischer Nachweis von Antikörpern

a) gegen Gelenkkapselgewebe

Bei der immunfluoreszenzserologischen Untersuchung auf Antikörper im Serum und in der Synovialflüssigkeit gegen Bestandteile des artikulären und periartikulären Gewebes konnte weder mit dem homologen noch mit dem heterolen Gewebe ein für die rheumatoide Arthritis typischer Befund erhoben werden. Änderungen der Serumverdünnung auf 1 : 10 und 1 : 5, sowie der Gewebefixierung (in Aceton und absolutem Methylalkohol) erbrachten kein anderes Ergebnis.

b) Nachweis organspezifischer und unspezifischer Antikörper

Untersucht wurden 35 Seren verschiedener Patienten. Die Befunde sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Antikörper gegen	Anzahl der Patienten	relative Häufigkeit (in %)
Kerne (ges.)	20	57
-homologe Niere	15	43
-heterologe Niere	11	31
-Magenschleimhaut	13	37
Mitochondrien	–	–
glatte Muskulatur	2	(6)
Gefäßendothel (ges.)	19	54
-Schilddrüse	19	54
-Leber	1	(3)
-Niere	-	-
Magenschleimhaut	7	20
Schilddrüsengewebe	-	-
feingranuläre Fluoreszenz	5	14

: Immunfluoreszenzserologische Befunde bei 35
n von Patienten mit PCP.

Antikörper unterschiedlicher fluoreszierender Stärke fanden sich bei 26 Patienten. 20 Patienten hatten Antikörper gegen Kerne, davon 15 gegen homologe Nierenkerne, 11 gegen heterologe Nierenkerne und 13 gegen Kerne der Magenschleimhaut. Organspezifische Antikörper konnten in 7 Fällen gegen Magenschleimhaut,nicht jedoch gegen Schilddrüsengewebe nachgewiesen werden. Auffallend war, daß insgesamt 19 der 35 Patientenseren mit homologem Gefäßendothel der Schilddrüse reagierten, während diese Reaktion bei anderen Organen nicht nachweisbar war. Die bei virusassoziierten Erkrankungen häufig nachweisbaren Antikörper gegen glatte Muskulatur waren nur in 2 Fällen nachzuweisen. Bei 5 Patienten fand sich eine feingranuläre Fluoreszenz im Bereich aller Kryostatschnitte, bei der es sich wahrscheilich um Immunkomplexe handelte, die beim Waschvorgang nicht vollständig entfernt worden waren.

III. Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test (LMIT)

1. Bestimmung der optimalen Präinkubationszeit

Zur Ermittlung der günstigsten Präinkubationszeit wurden die Leukozytensuspensionen von 6 gesunden Zellspendern ohne Antigenzusatz in Polypropylenröhrchen inkubiert. Von jeder Suspension wurden in Intervallen von jeweils 30 min, beginnend bei 1 Std. bis einschließlich 4 Std., und nach 6 Std.

Präinkubation / Versuchsperson	keine	1 Std.	2 Std.	2,5 Std.	3 Std.	3,5 Std.	4 Std.	6 Std.
(1)	1.00	0.96	0.97	0.93	0.80	0.69	0.48	0.24
(2)	1.00	0.94	0.92	0.90	0.77	0.70	0.80	0.78
(3)	1.00	1.17	1.04	0.89	0.84	0.65	0.65	0.37
(4)	1.00	1.04	1.03	0.87	0.83	0.71	0.65	0.50
(5)	1.00	0.86	0.92	0.80	0.85	0.64	0.61	0.48
(6)	1.00	1.06	1.07	0.91	0.77	0.75	0.78	0.57

Tab. 4: Stärke der Migration in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit. Die bei zunehmender Präinkubationsdauer gefundenen Migrationsflächen sind zu dem ohne Präinkubation ermittelten Wert in Relation gesetzt.

je 4 Portionen à 10 µl (= $1 \cdot 10^6$ Granulozyten) in die Agarosebohrungen gefüllt.

Die ermittelten Migrationsindices, bezogen auf die Ansätze ohne Präinkubation, zeigt Tab. 4 und Abb. 5.

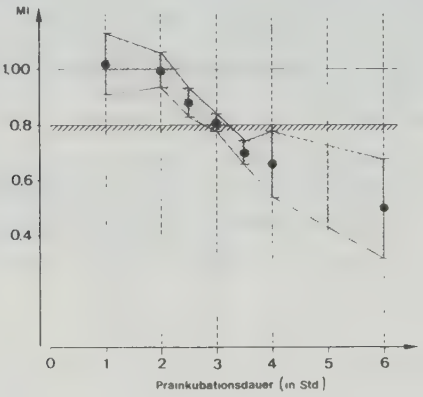


Abb. 5: Wanderung normaler Granulozyten bei zunehmender Präinkubationsdauer.

Die Abbildung zeigt deutlich, daß mit der Dauer der Präinkubation die Migrationsfähigkeit der Granulozyten abnimmt, wobei sich deutliche Unterschiede bereits nach 3 Stunden zeigen. Deshalb konnte die Inkubationsdauer der Leukozyten mit dem Antigen in den weiteren Versuchen nur 2 Stunden durchgeführt werden.

2. Einfluß von Immunkomplexen auf die Migration normaler Leukozyten

Um den Einfluß von Immunkomplexen auf die Leukozytenmigration zu untersuchen, wurden die im Antikörper-Überschuß, in der Äquivalenzzone und im Antigen-Überschuß gewonnenen Albumin-Anti/Albumin-Immunkomplexe in Eagles Dulbecco's Medium 1 : 10 verdünnt und, analog den Kulturüberständen

beim indirekten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test, dem Testsystem zugesetzt.

Der Einfluß der vorwiegend im Antigen-Überschuß gewonnenen Überstände auf die Wanderung der Granulozyten war bei den 4 getesteten Spendern mit Ausnahme des Spenders (2) hinsichtlich einer hemmenden Wirkung äußerst gering. Es ließen sich vielmehr bei steigender Antigenkonzentration auch größere Migrationshöfe finden, die Indexwerte zwischen 1,4 und 1,6 erreichten, verglichen mit den ohne Antigenzusatz ermittelten Migrationshöfen. Die Überstände aus dem Bereich der Äquivalenzzone zeigten dagegen keinen stimulierenden Effekt, allerdings auch keine Hemmung.

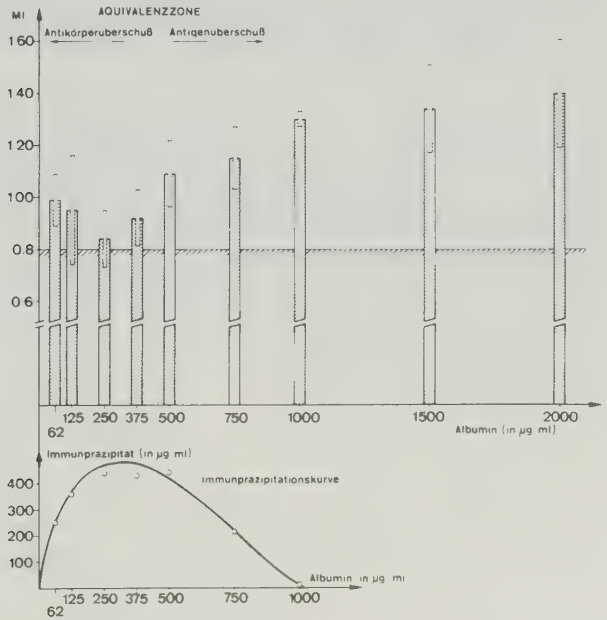


Abb. 6: Mittelwerte ($\bar{x} \pm s$) der Migrationsindices in Gegenwart von Albumin-Anti/Albumin-Komplexen. Auf der Abszisse sin die steigenden Albuminmengen (in ug/ml) eingetragen. Im unteren Teil der Abbildung ist die Präzipitationskurve dargestellt.

Zell-spender \ Albumingehalt des Alb./Anti-Alb./ Gemisches (in ug/ml)	0	62	125	250	375	500	750	1000	1500	2000
(1)	1.00	0.96	1.09	0.93	0.86	1.13	1.02	1.24	1.08	1.10
(2)	1.00	0.81	0.56	0.60	0.68	0.99	1.08	1.31	1.44	1.43
(3)	1.00	1.07	1.02	0.96	1.[illegible]	[illegible]98	1.26	1.31	1.42	1.47
(4)	1.00	1.01	1.10	0.92	1.14	1.24	1.23	1.28	1.43	1.59

Tab. 5: Migrationsindices der Granulozyten 4 gesunder Zellspender bei zunehmendem Immunkomplexgehalt des Mediums. Die nach Zugabe der Immunkomplexe errechneten Werte beziehen sich auf die Größe der Migrationshöfe, die ohne Zusatz von Albumin 1 gesetzt wurden.

[illegible] im direkten und indirekten Test an Tuberkulinpositiven und -negativen Versuchspersonen

Um feststellen zu können, ob Seren von Patienten mit PCP die Inhibition der Leukozytenmigration aufheben können, wurde zunächst versucht, mit den Leukozyten mehrerer Tuberkulinpositiver Versuchspersonen eine spezifische Migrationsinhibition hervorzurufen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Im direkten Test wurden die Leukozyten der Probanden mit 100 µg Tuberkulin "GT" (Behringwerke AG) /ml 2 Std. lang inkubiert und anschließend ins Agarosemedium überführt. Die Zellspender 4, 6, 7 und 8 zeigten eine besonders starke Hemmreaktion mit Indexwerten zwischen 0,75 und 0,65.Darüber hinaus wurden die Lymphozyten der Versuchspersonen 24 Std. mit 50, 100 und 200 µg Tuberkulin "GT" /ml inkubiert und deren Überstände dann mit den Leukozyten eines Tuberkulin-negativen Zellspenders zusammengebracht. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 6 dargestellt. Konzentrationen von 100 und 200 µg Tuberkulin "GT" /ml führten bei den

Probanden 4-8 zu einer deutlichen LIF-Produktion, die die Wanderung bis auf Indexwerte um 0,6 hemmte.

		Migrationsindices			
Patient	Haut-test	direkter Test	indirekter Test		
			50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml
(1)	-	0.98	1.06	0.99	1.03
(2)	-	0.98	0.96	0.89	0.99
(3)	-	0.97	0.97	0.97	0.95
(4)	+	0.70	0.82	0.65	0.64
(5)	+	0.83	0.78	0.71	0.59
(6)	+	0.75	0.74	0.70	0.69
(7)	+	0.65	0.92	0.60	0.66
(8)	+	0.69	0.86	0.70	0.66

Tab. 6: Migrationsindices bei Tuberkulinpositiven und Tuberkulinnegativen Probanden im direkten und indirekten LMIT.

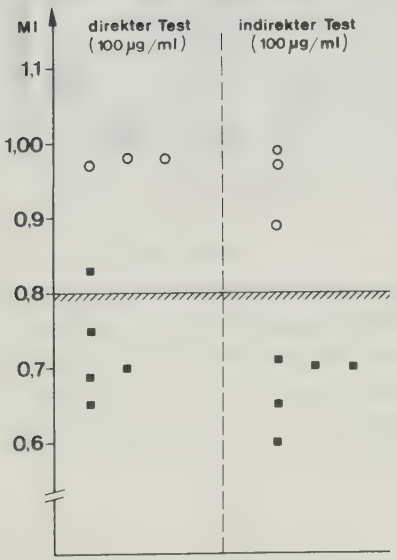
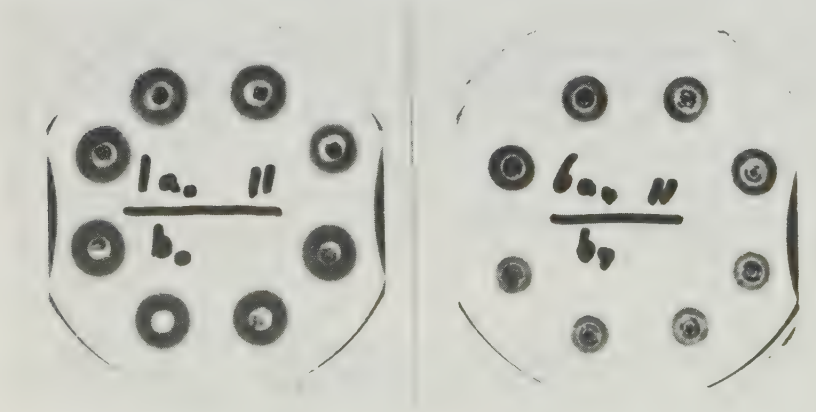


Abb. 7:

Migrationsindices Tuberkulinpositiver und -negativer Versuchspersonen bei Inkubation mit Tuberkulin (100 µg/ml). (Offene Kreise: negativer Hauttest, schwarze Quadrate:positiver Hauttest).

Wie aus Abbildung 7, in der die Ergebnisse bei 5 Tuberkulinpositiven und 3 Tuberkulinnegativen Versuchspersonen übersichtlich dargestellt sind, hervorgeht, bestand somit eine gute Korrelation zwischen den in-vivo gefundenen Hauttesten und dem LIF-Nachweis in-vitro.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse eines direkten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Testes bei einer Tuberkulinnegativen und einer Tuberkulinpositiven Versuchsperson dargestellt (Proband Nr.3 und Nr.7 aus Tab.6). In der oberen Hälfte sind die Migrationshöfe der Leukozyten dargestellt ohne Zusatz von Antigen, in der unteren Hälfte bei Zugabe von 100 µg Tuberkulin "GT"/ml. Bei dem Tuberkulinpositiven Zellspender ist die Fläche der Migrationshöfe unter Tuberkulineinfluß etwa auf die Hälfte zurückgegangen, bei der Tuberkulinnegativen Versuchsperson dagegen nicht.



Hauttest (-) Hauttest (+)

Abb. 8: Direkter Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test bei einer Tuberkulinnegativen und -positiven Versuchsperson. Im oberen Teil der Schale wandern die Leukozyten ohne Zusatz von Antigen. Im unteren Teil wurden die Leukozyten mit Antigen (hier: 100 µg Tuberkulin "GT") inkubiert.

4. Direkter Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test mit Leukozyten von Patienten mit PCP unter Verwendung von aggregiertem Immunglobulin und heterologem,homogenisiertem Synovialgewebe als Antigen

Um festzustellen, ob eine zellvermittelte Immunreaktion gegenüber aggregiertem Immunglobulin oder Bestandteilen des Synovialgewebes besteht, wurden Leukozyten von Patienten in einer Konzentration von 0,25 10^9/ml mit diesen beiden möglichen Antigenen inkubiert. Aggregiertes Immunglobulin wurde in Konzentrationen von 100, 1 000 und 10 000 µg/ml getestet, der Überstand des Homogenats von Rindersynovialgewebe in Konzentrationen von 100 und 200 µg/ml. Alle 8 untersuchte Patienten hatten eine gesicherte PCP.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

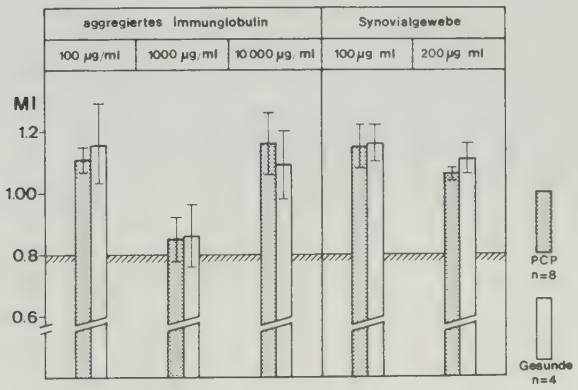


Abb. 9: Mittelwerte ($\bar{x} \pm s$) der Migrationsindices bei Verwendung von aggregiertem Immunglobulin und homogenisierter Synovialmembran als Antigen im direkten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test.

Mit keiner der beiden Antigenpräparationen konnte eine spezifische Migrationsinhibition beobachtet werden. Auch Änderungen der Antigenkonzentrationen brachten kein anderes Ergebnis. Aggregiertes Immunglobulin bei einer Konzentration von 1 000 µg/ml führte zwar zu einer Hemmung der Wanderung der Leukozyten, das gleiche Phänomen ließ sich jedoch auch mit Leukozyten normaler Spender beobachten.

5. Untersuchung der Seren und Synovialflüssigkeiten von PCP-Patienten auf Hemmaktivität im Agarose-Test mit Granulozyten gesunder Spender als Indikatorzellen

Mit dieser Modifikation des Agarose-Testes wurden Seren und Gelenkergüsse von PCP-Patienten auf das Vorkommen von bereits gebildetem Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) untersucht.

a) Untersuchung der Seren

Die Konzentration der 25 untersuchten Seren im Test betrug 40%. Als Bezugsgröße diente der Mittelwert dreier mitgetesteter Kontrollseren, die fast immer identische Migrationsflächen aufwiesen. Keines der getesteten Seren wies einen Migrationsindex von weniger als 0,8 und mehr als 1,22 auf. Alle Patientenseren lagen somit noch im üblichen Streubereich.

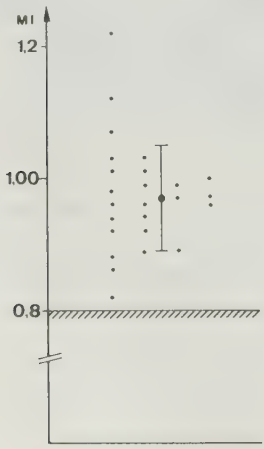


Abb. 10: Migrationsindices normaler Granulozyten in Gegenwart der Seren von 25 Patienten mit PCP.

b) Untersuchung der Synovialflüssigkeiten

Synovialflüssigkeiten wurden bei diesem Test in einer Konzentration von 25 und 50% verwandt. Der Durchschnitt der als Kontrollen mitgetesteten 12 mechanisch bedingten Ergüsse wurde als Migrationsindex (MI) =1 definiert.

Bei keiner der beiden Konzentrationen ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den rheumatischen und den mechanisch bedingten Ergüssen nachweisen.

Die ermittelten Migrationsindices, sowie dazugehörige klinische Parameter sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Nr.	Patient	Diagnose	Geschl.	Alter	Rheumafaktor	Klin. Stad.	Röntgenol. Stad.	Migrationsindex 25%	50%
(1)	W.H.	ECP	w.	41		II	2	.44	0.93
(2)	M.B.	"	w.	61	-	III	2	1.14	1.10
(3)	M.S.	"	w.	52	+	III	2	1.05	1.00
(4)	E.T.	"	w.	40	-	II	2	1.02	0.97
(5)	L.S.	"	w.	62	+	II	3	1.03	0.97
(6)	U.B.	"	w.	23	-	I	3	0.67	0.88
(7)	F.U.	"	w.	71	+	II	1	0.87	0.81
(8)	A.U.	"	w.	62	-	II	3	.97	0.90
(9)	M.M.	"	w.	62	-	III	2	0.91	0.97
(10)	B.W.	"	w.	36	+	I	3	1.09	1.16
(11)	E.Z.	"	m.	52	+	II	2	0.94	0.90
(12)	J.T.	"	w.	41	-	III	3	0.94	1.05
(13)	I.M.	"	w.	20	+	III	2	0.89	0.99
(1)	B.B.	Arthrose	m.	58				1.05	1.00
(2)	P.K.	Osteoch. dissec.	m.	44				1.03	1.04
(3)	E.K.	Arthrose	w.	62				0.94	0.82
(4)	F.W.	Bandabriß	m.	24				1.01	0.98
(5)	M.S.	Arthrose	w.	70				0.98	0.97
(6)	M.W.	Chondro-matose	w.	66				0.91	0.91
(7)	P.S.	Menisko-pathie	m.	46				1.07	1.03
(8)	G.S.	Osteolyse	w.	48				0.94	0.93
(9)	H.S.	Arthrose	m.	54				0.98	1.01
(10)	V.R.	"	w.	46				1.08	1.03
(11)	C.F.	"	w.	69				0.99	1.05
(12)	I.M.	"	w.	65				1.04	1.04

Tab. 7: Klinische Daten und Migrationsindices von Synovialflüssigkeiten rheumatischer und mechanischer Genese.

In Abbildung 11 sind die Migrationsindices normaler Granulozyten in Gegenwart von 13 rheumatischen und 12 mechanisch bedingten Gelenkergüssen gegenübergestellt.

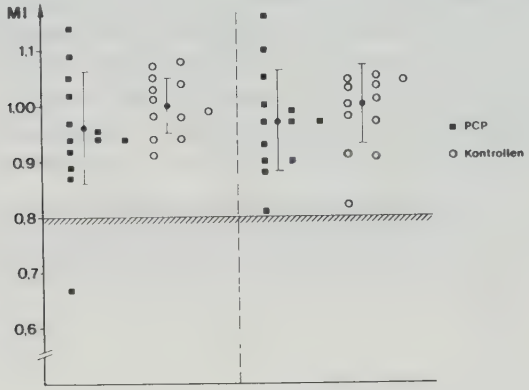


Abb. 11: Migrationsindices normaler Granulozyten in Gegenwart von rheumatischen und mechanisch bedingten Gelenkergüssen. a) in einer Konzentration von 25%, b) in einer Konzentration von 50%.

6. Einfluß der Seren und Gelenkergüsse von Patienten mit PCP auf die spezifische, durch Tuberkulin induzierte Migrationshemmung

Bei allen Versuchen wurden parallel die Leukozyten von 2 Spendern verwandt, die eine stark positive Tuberkulin-Hautreaktion zeigten und deren Leukozyten unter Tuberkulin-Einfluß eine konstante Migrationsinhibition mit einem Index von 0,70 bis 0,75 aufwiesen.

a) Untersuchung der Seren

16 Seren von 12 Patienten mit gesicherter rheumatoider Arthritis wurden nach der unter VIII,D beschriebenen Me-

thode dem direkten Agarose-Test zugesetzt, um deren Einfluß auf die Tuberkulininduzierte, spezifische Migrationsinhibition zu untersuchen.

Durch die Zugabe der Seren wurde in sämtlichen Fällen die spezifische Migrationsinhibition in unterschiedlichem Ausmaß vermindert, während dieses Phänomen bei Zugabe von Seren Gesunder und kommerzieller Kontrollseren nicht zu beobachten war. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0{,}0005$).

In Abbildung 12 ist an einem Beispiel dargestellt, wie durch Zugabe eines Rheuma-Serums die spezifische Migrationsinhibition wieder aufgehoben wird. In der unteren Hälfte der links dargestellten Schale sieht man die Migrationshemmung der Leukozyten durch Tuberkulin "GT". In der unteren Hälfte der rechten Schale ist, trotz Gegenwart von Tuberkulin, die spezifische Migrationshemmung durch Zugabe eines Rheuma-Serums aufgehoben. Die beiden oberen Bildhälften sind die Kontrollen.

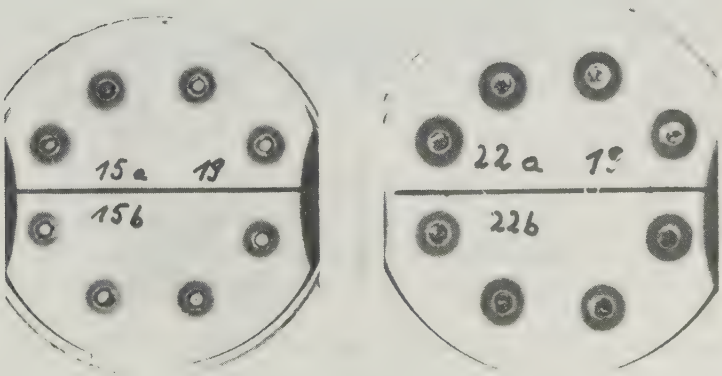


Abb. 12: Aufhebung der Migrationsinhibition durch Serum eines Patienten mit PCP. Links: Leukozyten einer Tuberkulinpositiven Versuchsperson in Gegenwart von Tuberkulin. Rechts: Zugabe des Serums eines Patienten mit PCP.

Aus Abbildung 13 ist zu ersehen, wie die einzelnen Seren die Migrationsinhibition beeinflußten.

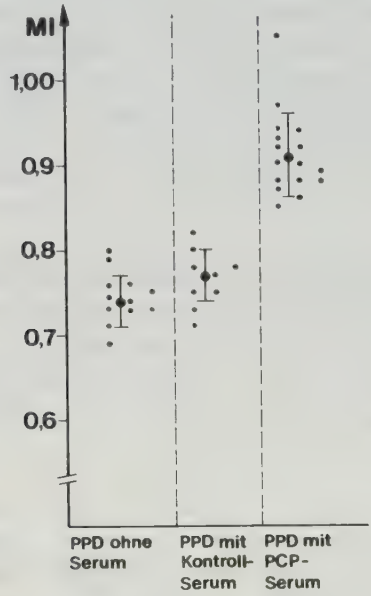


Abb. 13: Aufhebung der Tuberkulininduzierten Migrationsinhibition durch Seren von Patienten mit PCP (PPD = purified protein-derivate = Tuberkulin "GT").

Um den Mechanismus der Aufhebung der Migrationsinhibition genauer zu untersuchen, wurde LIF-haltigen Überständen, die durch Inkubation der Lymphozyten Tuberkulinpositiver Versuchspersonen mit Tuberkulin erhalten worden waren, PCP-Serum zugesetzt. Diejenigen Seren von Patienten mit PCP, die im direkten Test die Migrationsinhibition am stärksten aufgehoben hatten, wurden den Überständen in einer Konzentration von 40% zugegeben. Die Hemmwirkung dieses Gemisches wurde dann in einem 2. Schritt an Leukozyten gesunder, Tuberkulin-

negativer Zellspender ausgetestet. Dabei zeigte sich, daß die Seren jetzt nicht mehr die Migrationshemmung aufzuheben vermochten; das heißt,die Hemmung war mit und ohne Zugabe von Rheuma-Serum gleich stark.

b) Untersuchung der Synovialflüssigkeiten

Im Gegensatz zu den Seren fand sich nach Zugabe von Gelenkergüssen zum direkten Agarose-Test keine Aufhebung der Migrationsinhibition. Die bei einigen PCP-Synovialflüssigkeiten gefundene leichte Aufhebung der Migrationsinhibition war statistisch nicht signifikant ($p < 0,1$).

Die Ergebnisse bei 6 rheumatischen und 4 mechanisch bedingten Gelenkergüssen sind in Abbildung 14 dargestellt.

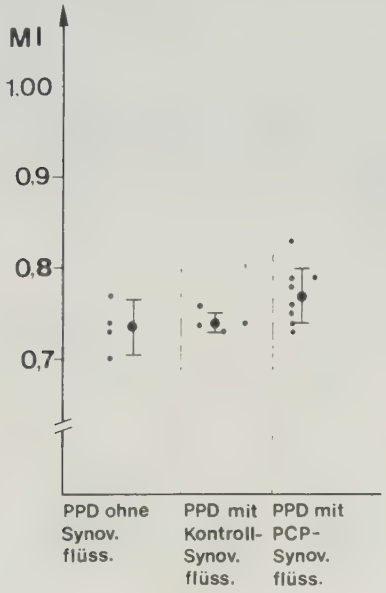


Abb. 14: Beeinflussung der Tuberkulininduzierten Migrationsinhibition durch rheumatische und mechanisch bedingte Gelenkergüsse.

IV. Beeinflussung der PHA-induzierten Lymphozytentransformation durch Seren und Gelenkergüsse von Patienten mit PCP

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um festzustellen, ob im Serum und in der Synovialflüssigkeit von PCP-Patienten Faktoren nachgewiesen werden können, die die Teilung PHA-stimulierter, normaler Lymphozyten hemmen.

a) Untersuchung der Seren

Getestet wurden 50 Seren von 31 Patienten mit gesicherter rheumatoider Arthritis. Hierbei zeigte sich, daß alle Seren in unterschiedlichem Ausmaß den Einbau von radioaktivem Thymidin hemmten. Dagegen beeinflußten die Seren der Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen die Lymphozytentransformation kaum (durchschnittlicher Hemmindex 0,82), ebenso wie die Seren jener Patienten, bei denen eine rheumatoide Arthritis nur vermutet wurde (durchschnittlicher

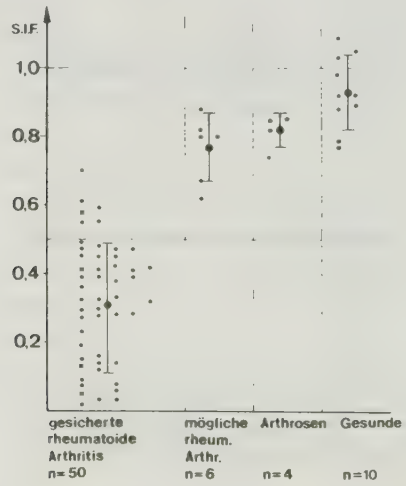


Abb. 15: Hemmfaktorindices der Seren von Patienten mit gesicherter und möglicher rheumatoider Arthritis; als Kontrollen Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen und Gesunde.

Hemmindex O,77). Die Unterschiede zwischen der Gruppe mit gesicherter rheumatoider Arthritis und den anderen Gruppen sind statistisch signifikant (p O,OOO5).

Die Korrelation zwischen Hemmfaktoraktivität und klinischem Stadium, entzündlicher Aktivität, klinischem Verlauf, Nachweis des Rheumafaktors, sowie der Art der Therapie zeigen die Abbildungen 16 a) bis 16 e).

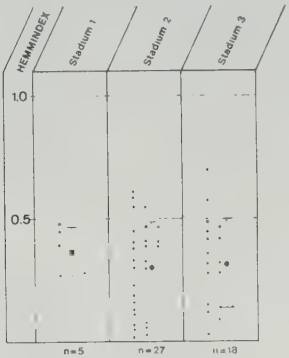


Abb. 16 a): SIF und klinisches Stadium.

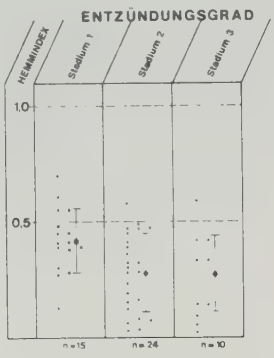


Abb. 16 b): SIF und entzündliche Aktivität.

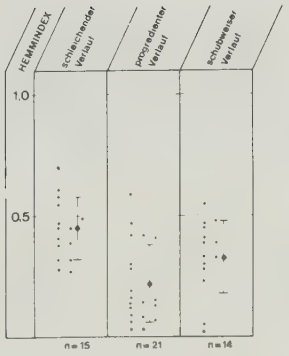


Abb. 16 c): SIF und klinischer Verlauf.

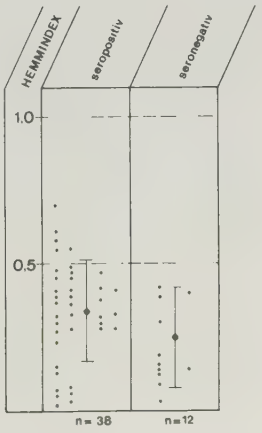


Abb. 16 d): SIF und Rheumafaktornachweis.

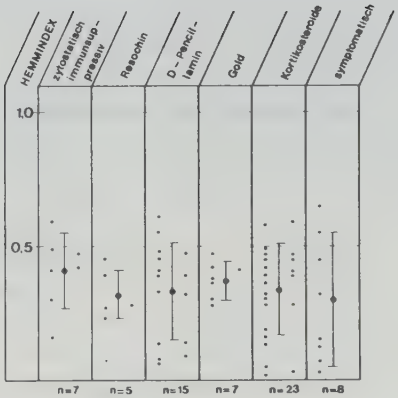


Abb. 16 e): SIF und Therapie.

Zwischen der Stärke der Hemmfunktion und dem klinischen Stadium, der entzündlichen Aktivität, der Art der Therapie und dem Nachweis des Rheumafaktors bestand kein Zusammenhang. Dagegen scheint eine Korrelation zu bestehen zwischen der Stärke des Hemmfaktors und dem klinischen Verlauf. So fand sich unter 21 Seren von 10 Patienten mit progressivem Verlauf 13 mal, das entsprach 7 Patienten ein Hemmfaktor unter 0,2; während ein so niedriger Index in der Gruppe mit schleichendem Verlauf überhaupt nicht, in der Gruppe mit schubweisem Verlauf nur zweimal vorkam. Der zwischen der schleichenden und der progressiven Verlaufsform gefundene Unterschied war signifikant ($p < 0{,}005$), nicht jedoch der Unterschied zwischen schubweisem und progressivem Verlauf ($p < 0{,}025$).

b) Untersuchung der Synovialflüssigkeiten

12 rheumatische und 7 mechanisch bedingte Gelenkergüsse von verschiedenen Patienten wurden auf Serum-Hemmfaktor hin untersucht. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis. Nur 2 der getesteten Rheuma-Ergüsse hatten einen Hemmindex von weniger als 0,5, während von den mechanisch bedingten Ergüssen keiner unter dieser Grenze lag. Der Unterschied zwischen

den beiden Patientengruppen war somit nicht signifikant ($p < 0{,}025$).

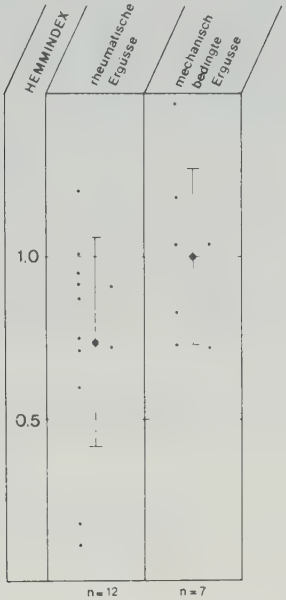


Abb. 17: Hemmfaktorindices von rheumatischen und mechanisch bedingten Gelenkergüssen.

Bei 7 Patienten, bei denen gleichzeitig Serum und Synovialflüssigkeit entnommen worden war, konnte der Hemmfaktorgehalt in beiden Körperflüssigkeiten verglichen werden. Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, ist der Hemmfaktor meist nur im Serum nachweisbar. Offen muß bleiben, ob bei einer Hemmung mit Synovialflüssigkeit immer eine Hemmung mit Serum zu beobachten ist. Die Beobachtung bei Patient (7) könnte darauf hinweisen.

Nr.	Patient	Geschl.	Alter	Rheuma-faktor	klin. Stad.	entzündl. Aktiv.	S. I. F. Serum	S. I. F. Syn.fl.
(1)	W.L.	w.	22	+	III	3	0.42	1.01
(2)	E.O.	w.	62	+	III	2	0.32	0.91
(3)	L.U.	w.	58	+	III	2	0.58	0.81
(4)	K.M.	m.	67	+	III	2	0.45	0.87
(5)	A.U.	w.	62	-	II	3	0.59	0.72
(6)	F.U.	w.	71	+	II	1	0.13	0.95
(7)	W.H.	w.	70	-	III	3	0.14	0.11

Tab. 8: Hemmaktivität simultan entnommener Seren und Synovialflüssigkeiten auf PHA-stimulierte, normale Lymphozyten.

c) Vergleich zwischen Serum-Hemmfaktor und Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor

Bei 8 Patienten mit gesicherter rheumatoider Arthritis wurde in 11 Seren sowohl die Beeinflussung der Lymphozyten-

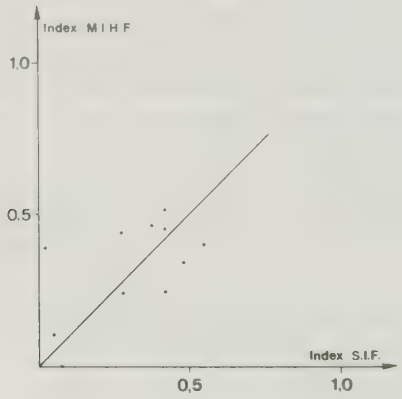


Abb. 18: Zusammenhang zwischen Serum-Hemmfaktor (SIF) und Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor (MIHF) im Serum.

transformation (Serum-Hemmfaktor, SIF) als auch die Beeinflussung der Migrations-Inhibition (Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor, MIHF) bestimmt. In Abbildung 18 sind die beiden Werte einander zugeordnet.

Man erkennt, daß diejenigen Seren, die die Migrationshemmung am stärsten aufhoben, auch die Teilung der PHA-stimulierten Lymphozyten stark unterdrückten. Jedoch ist, bedingt durch die kleine Anzahl, diese Korrelation statistisch nicht zu sichern.

DISKUSSION

I. Direkter und indirekter Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test unter Verwendung von Tuberkulin als Antigen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit der Agarplattentechnik nach CLAUSEN durchgeführt, bei der die Migration von Human-Leukozyten in Gegenwart eines Antigens unter der Agarose gemessen wird (15). Unsere Untersuchungen mit Tuberkulin "GT" als Antigen konnten die Ergebnisse von CLAUSEN bestätigen. Im direkten und indirekten Test ergab sich eine gute Korrelation zwischen der Migrationshemmung unter der Agaroseplatte und dem Ergebnis des Tuberkulin-Hauttestes bei 5 Tuberkulinpositiven und 3 Tuberkulinnegativen Versuchspersonen. Richtet man sich nach dem von CLAUSEN angegebenen Migrationsindex von 0,8 als Grenze zwischen Hemmung und Nichthemmung, so war lediglich beim direkten Test eine Tuberkulinpositive Versuchsperson mit einem Index von 0,83 im Normbereich. Die von CLAUSEN beschriebene erhöhte Empfindlichkeit des indirekten Testes (16) war ebenfalls nachzuweisen: dabei gab es weder ein falsch positives noch ein falsch negatives Ergebnis.

II. Unspezifischer Einfluß von Immunkomplexen auf die Leukozyten-Migration

Im Hinblick auf spätere Versuche, bei denen die Beeinflussung der Leukozyten-Migration durch Seren und Synovialflüssigkeiten von Patienten mit PCP untersucht werden sollte, schien es wichtig, die Wirkung von Immunkomplexen auf die Migration normaler Granulozyten zu untersuchen, da nach ROSENTHAL Immunkomplexe im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit PCP in einer Häufigkeit von ca. 75% auftreten (57).

Der Einfluß der in-vitro präparierten Albumin-Anti/Albumin-Komplexe auf die Migration der Leukozyten hing von deren Konzentration und physikalischem Zustand (präzipitiert oder gelöst) ab. Bei Zugabe von präzipitierten Immunkomplexen

aus der Äquivalenzzone der Präzipitationskurve ergab sich eine geringgradige Migrationshemmung, während sich in Gegenwart gelöster Immunkomplexe aus dem Bereich des Antigenüberschusses eine eindeutige Stimulation der Migration zeigte. Die Fläche der Migrationshöfe bei Zusatz von gelösten Immunkomplexen lag um bis zu 50% über dem Ausgangswert.

Diese Befunde stimmen mit denjenigen von BLANK überein (5), stehen jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen von SPITLER et al., bei denen die Wanderung von Meerschweinchen-Peritoneal-Makrophagen aus Kapillaren durch KLH-Anti/KLH-Immunkomplexe generell gehemmt wurde (66).(KLH = keyhole limpet hemocyanin, ein Farbstoff der Napfschnecke).

Diese Diskrepanz könnte zum einen ihre Ursache in den verschiedenen Antigen-Antikörper-Komplexen finden, zum anderen daran liegen, daß SPITLER et al. Makrophagen als Migrationszellen benutzten, BLANK und wir dagegen Granulozyten verwandten. Die Ursache der Migrationsstimulation ist noch unklar, möglicherweise kam sie durch günstigere Kulturbedingungen (zunehmende Albuminkonzentration) zustande.

III. Stimulierung der Leukozyten von Patienten mit PCP mit aggregiertem Immunglobulin und heterologem Synovialextrakt

Im direkten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test wurden die Zellen von 8 Patienten mit PCP und 4 gesunden Kontrollpersonen gegen aggregierte Immunglobuline und einen Synovialextrakt getestet. Uns interessierte dabei die Frage, ob sich mit diesem Test eine spezifische Sensibilisierung der Lymphozyten von PCP-Patienten gegenüber aggregiertem Immunglobulin nachweisen läßt. Mit diesem Antigen reagieren etwa 80% der Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis in Form eines positiven Rheumafaktors. Synovialextrakt wurde untersucht, da die dichten Lymphozyteninfiltrationen in der Synovialmembran des rheumatisch entzündeten Gelenks (81) dafür sprechen, daß zellvermittelte Immunreaktionen gegen membranassoziierte Antigene ablaufen.

Mit keiner der beiden Antigenpräparationen ließ sich jedoch eine spezifische Sensibilisierung nachweisen. Eine Konzentrationsabhängigkeit bestand nicht.

ROTHENBERGER (58), FRÖLAND und GAARDER (23), BROSTOFF et al.(10) und ZITNAN et al.(80) konnten dagegen mit aggregiertem Immunglobulin im Migrations-Hemm-Test eine positive Reaktion beobachten, während KACAKI et al.(30) und RUNGE und MILLS (61) mit demselben Antigen im Lymphozyten-Transformations-Test keine spezifische Sensibilisierung nachweisen konnten. Auch scheint die Aggregation der Immunglobuline deren Antigenität zu verstärken, bzw. erst zu ermöglichen.

Die positiven Ergebnisse, die mit Synovialextrakt als Antigen erzielt wurden, sind möglicherweise auf deren Kontamination mit Immunglobulinen zurückzuführen, benutzten doch SCHEIFFARTH und WARNATZ (62), ROTHENBERGER und THIELE (60) und BACON et al.(4) Synovialmembranen von PCP-Patienten, in denen Immunglobuline nachgewiesen wurden (81). Lediglich THONAR und SWEET konnten auch bei Verwendung von Synovialgewebe normaler Gelenke eine Migrationshemmung erreichen (73), während die Ergebnisse von BACON et al.(4) und MUDRA et al.(45) mit unseren Untersuchungen übereinstimmen.

Diese Aufzählung läßt die Schwierigkeiten erkennen, die immer noch bei der Interpretation der in-vitro-Teste zum Nachweis einer zellvermittelten Immunreaktion bestehen. Andersartige Methoden und unterschiedliche Präparationen der verwandten Antigene erschweren die exakte Einordnung der Ergebnisse. Darüber hinaus können die Resultate des Lymphozyten-Transformations-Testes und des Migrations-Inhibitions-Testes nicht miteinander verglichen werden, da mit den beiden Methoden verschiedene Lymphozytenaktivitäten erfaßt werden (14).

Während unsere Untersuchungen mit der CLAUSEN-Technik durchgeführt wurden, verwandten die meisten der oben zitierten Autoren die Methode von SÖBORG und BENDIXEN, bei der die Wanderung von Leukozyten aus Kapillaren gemessen wird (65). Auch die Herkunft und Präparation der Antigene unter-

schied sich in wesentlichen Punkten von den obengenannten Untersuchungen. Möglicherweise erklären diese methodischen Unterschiede die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse.

IV. Beeinflussung der Migration normaler Leukozyten durch Serum und Synovialflüssigkeit von Patienten mit PCP

Dieser Versuchsreihe lag die Vorstellung zugrunde, daß im Verlauf einer zellvermittelten Immunreaktion an der Synovialmembran des rheumatisch entzündeten Gelenks Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) entsteht, der dann in die Synovialflüssigkeit bzw. in das Serum abgegeben wird und dort nachgewiesen werden kann.

Bei der Untersuchung der Seren von 25 Patienten mit PCP konnte im Vergleich zu Normalseren jedoch keine wesentliche Beeinflussung der Leukozytenmigration festgestellt werden. Der Migrationsindex lag in allen Fällen im üblichen Streubereich von 0,8 bis 1,2. Ein ähnliches Ergebnis fand sich bei der Untersuchung der Synovialflüssigkeiten von 13 Patienten mit rheumatoider Arthritis und 12 Patienten mit mechanisch bedingten Gelenkergüssen.

Im Gegensatz dazu konnten STASTNY et al. anhand des Tiermodells einer chronischen Polyarthritis des Kaninchens, hervorgerufen durch wiederholte intraartikuläre Injektionen von Eialbumin und Rinderserumalbumin, zeigen, daß im zellfreien Kulturüberstand der Synovialzellen dieser Tiere sich eine nicht dialysierbare Substanz befand, die die Wanderung von Makrophagen aus Kapillaren hemmte (67). Derselben Arbeitsgruppe gelang es, diesen Faktor auch bei 16 von 22 rheumatischen Gelenkergüssen nachzuweisen, allerdings auch in 20 - 30% der Ergüsse, die degenerativ oder durch verschiedene nicht rheumatische Entzündungen bedingt waren (68). STIEHL et al. bestätigten diese Befunde in einem anderen Testsystem unter Verwendung normaler peripherer Leukozyten (70).

Die dabei angewandten Methoden unterschieden sich allerdings in wesentlichen Punkten von der unserigen. STASTNY et al. konzentrierten ihr Untersuchungsmaterial durch Dialy-

sierung und Lyophilisierung, während STIEHL et al. Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) noch in Verdünnungen der Synovialflüssigkeit von 1:500 nachweisen konnten. Um auszuschließen, daß die Konzentration an LIF für eine meßbare Migrationshemmung zu gering war, haben wir die Endkonzentration der Synovialflüssigkeit in der Zellsuspension auf 50% erhöht, konnten aber auch in dieser hohen Konzentration keine Hemmaktivität nachweisen. Bei der von STIEHL et al. verwandten Methode könnte jedoch die Wirkung von LIF auf die Leukozyten intensiver als bei unserer Methode gewesen sein, da sie die zu untersuchende Synovialflüssigkeit in das flüssige Kulturmedium, in dem sich die Zellen bewegten, zugaben und dadurch ein besserer Kontakt zwischen den Zellen und dem LIF zustande kam. Wie schwierig diese Ergebnisse zu interpretieren sind, wird deutlich, wenn man noch die migrationsstimulierenden Faktoren, wie z.B. die gelösten Immunkomplexe, berücksichtigt.

V. Beeinflussung der spezifischen Migrationsinhibition durch Seren und Gelenkergüsse von Patienten mit PCP

Seren von 12 Patienten mit PCP wurden im direkten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test zugesetzt, um zu prüfen, ob die bei einer rheumatoiden Arthritis beschriebenen immunsuppressiven Serumfaktoren, die einen hemmenden Einfluß auf die Lymphozytenteilung in der gemischten Lymphozytenkultur zeigten (78,34), auch die spezifische, Tuberkulin-induzierte Migrationsinhibition zu beeinflussen in der Lage sind.

In sämtlichen Fällen konnte eine Verminderung bzw. Aufhebung der spezifischen Migrationsinhibition festgestellt werden. Kommerzielle Kontrollseren und Seren gesunder Probanden hatten dagegen keinen Einfluß auf die spezifische Migrationshemmung. Dieser Unterschied war statistisch signifikant und bei wiederholten Kontrollen konstant nachweisbar. Dagegen war mit den Synovialflüssigkeiten der PCP-Patienten ein solcher Effekt nicht oder nur schwach nachzuweisen.

Diese Befunde legen nahe, daß im Serum von PCP-Patienten Faktoren enthalten sind, die wahrscheinlich die Antigenerkennung, sowie die Synthese, Freisetzung oder Wirkung von Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) beeinflussen können. Um zu differenzieren, in welche Reaktion des Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Testes (LMIT) der Faktor eingreift, wurden Überstände aus dem indirekten LMIT, in denen sich bereits LIF befand, mit Leukozyten Tuberkulinnegativer Zellspender inkubiert. Während unter diesen Bedingungen eine Migrationshemmung zu beobachten war, führte der Zusatz von Seren, die im direkten LMIT die Migrationshemmung aufgehoben hatten, jetzt nicht mehr zu einer Aufhebung der Migrationshemmung. Das bedeutet, daß dieser Serumfaktor Einfluß auf die Synthese von LIF, nicht jedoch auf seine Wirkung hat. Dieser Faktor wurde von uns Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor (MIHF) genannt.

Ein solcher Faktor wurde bisher kaum beschrieben. MORTENSEN et al. konnten mit isoliertem C-reaktiven Protein an Makrophagen denselben Effekt beobachten (44), d.h. die Zugabe von C-reaktivem Protein zu Lymphozytenkulturen verminderte deutlich die durch Antigene und Mitogene induzierte MIF-Produktion, hatte jedoch keinen Einfluß auf die Wirkung von bereits gebildetem MIF. Dennoch dürfte C-reaktives Protein nicht mit dem von uns gefundenen Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor identisch sein, da in den meisten Synovialflüssigkeiten C-reaktives Protein nachgewiesen werden konnte, ohne daß es dadurch zu einer wesentlichen Beeinflussung der Migrationsinhibition gekommen wäre.

VI. Beeinflussung der Lymphozytentransformation durch Seren und Gelenkergüsse von Patienten mit PCP

Von besonderem Interesse erschien die Frage, ob die Unterdrückung einer zellvermittelten Immunreaktion, wie sie im Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test sichtbar wurde, auch im Lymphozyten-Transformations-Test (LTT) nachweisbar ist. CHAPARAS et al. berichteten nämlich, daß MIF-Produktion und Lymphozytenteilung zwei verschiedene Immunreaktionen

zugrund liegen (14). Dies beruht darauf, daß sich die Gruppe der T-Lymphozyten wiederum aus mehreren Subpopulationen zusammensetzt, die verschiedene Funktionen im Immunsystem haben (Übersicht: 12).

Um diese Frage zu klären, schien der LTT, mit dem unspezifischen Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) und normalen Lymphozyten durchgeführt, am geeignesten, da PHA selektiv auf T-Lymphozyten wirken soll (29). Bei Zugabe von Serum zu diesem Test läßt sich dessen Einfluß auf die Lymphozytenteilung, dargestellt durch die Einbaurate von ^{3H}-markiertem Thymidin, einfach bestimmen.

Untersucht wurden 50 Seren von 31 Patienten mit gesicherter rheumatoider Arthritis. Davon wiesen 45 einen Hemmfaktor mit einem Index von weniger als 0,5 auf; d.h. unter Serumeinfluß war die Teilungsrate der stimulierten Lymphozyten um mehr als die Hälfte zurückgegangen. Bei Zusatz von 12 rheumatischen Gelenkergüssen konnte dieser Effekt nur zweimal beobachtet werden.

Zwischen dem Ausmaß der Hemmung und dem klinischen Stadium, der Entzündungsaktivität, der Art der Therapie und dem Nachweis des IgM-Rheumafaktors bestand kein Zusammenhang, doch fand sich in der Gruppe von Patienten, deren Krankheit einen progredienten Verlauf nahm, besonders häufig eine sehr starke Hemmung mit einem Index von weniger als 0,2, so daß ihr Auftreten als ein für den Krankheitsverlauf prognostisch ungünstiger Parameter angesehen werden muß. Auch BRATTIG und BERG berichteten bei Verlaufskontrollen von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis, daß die Persistenz eines solchen Hemmfaktors den Übergang in die chronisch aggresive Verlaufsform anzeigt (8).

Immunsuppressive Faktoren, die die Lymphozytentransformation hemmen, konnten bisher bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen nachgewiesen werden: bei Urämie (46), akuter und chronischer Hepatitis (8), primärer biliärer Zirrhose (40), sekundärer Syphilis (37), multipler Sklerose (35), Ataxia teleangiectatica (41), Karzinomem (72,77) und bei Leukämien (27). Die meisten der aufgeführten Autoren wiesen

darauf hin, daß auch die Lymphozyten der Patienten eine verminderte Transformationsrate nach PHA-Stimulation zeigten und daß die Hautteste abgeschwächt waren.

Über die biochemische Natur dieses Serum-Hemmfaktors ist wenig bekannt. BRATTIG, der den Hemmfaktor bei der akuten und chronischen Hepatitis genauer untersuchte, konnte dabei folgende Befunde erheben: Das Molekulargewicht liegt zwischen 50 000 und 120 000 Dalton, der Faktor wird bei der Säulenchromatographie mit der Albuminfraktion eluiert, er wird durch 15 minütige Erhitzung auf 70°C inaktiviert, er hemmt sowohl die Antigen- wie auch die Mitogen-induzierte Lymphozytentransformation, seine Bindung an die Lymphozyten ist reversibel. Zytotoxische Antikörper konnten ausgeschlossen werden (7). Letzteres konnte auch in den eigenen Versuchen noch einmal bestätigt werden, da sich durch Trypanblaufärbung der Lymphozyten nach Testende zeigte, daß noch 90 - 95% der Lymphozyten in der Kultur lebten.

Eine auch im normalen Serum vorkommende Substanz ist das "Immunoregulative Alpha-Protein", kurz IRA genannt, das COOPERBAND et al. 1968 aus der Cohn-Fraktion IV des normalen menschlichen Serums anreichern konnten (17). Die Autoren fanden, daß dieses Protein die DNS- und Eiweißsynthese, sowie die Proliferation PHA- und Antigen-stimulierter Lymphozyten hemmt, wobei für die Hemmung der Antigenstimulierten Lymphozyten eine etwa 10 mal geringere Konzentration an IRA ausreichte (18). MENZOIAN et al. konnten durch Rosetteninhibitionsteste zeigen, daß IRA selektiv auf T-Zellen wirkt, die Funktion der B-Zellen aber unbeeinflußt läßt (42). DAVIS et al. fanden außerdem, daß IRA entweder mit der Antigenerkennung durch den Lymphozyten, der MIF-Synthese oder der MIF-Freisetzung interferiert, die Wirkung von bereits gebildetem MIF auf Makrophagen jedoch unbeeinflußt läßt (19). Diese Befunde decken sich weitgehend mit unseren Versuchsergebnissen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß es sich bei dem in den Rheuma-Seren nachgewiesenen immunsuppressiven Faktor um "Immunoregulatives Alpha-Protein" handelt, das bei Patienten mit rheumatoider Arthritis viel-

leicht in verstärktem Maße produziert wird.

Nicht außer Betracht gelassen werden darf der Einfluß, den Medikamente auf die Lymphozytenfunktion ausüben. Von Azetylsalizylsäure ist eine immunsuppressive Wirkung in-vitro seit langem bekannt (47), und PANUSH konnte zeigen, daß die Transformation normaler, PHA-stimulierter Lymphozyten durch fast alle Antirheumatika (Phenylbutazon, Indometacin, Gold, D-Penicillamin, nicht jedoch Resochin) in Konzentrationen, die den Serumspiegeln naheliegen, auf 50% herabgedrückt wird (49). Allerdings betrug in den eigenen Versuchen die Konzentration der Medikamente in der Zellkultur nur 1/5 des Serumspiegels, da der Serumanteil an der Kultur bei 20% lag. Ein Einfluß der im Serum vorhandenen Medikamente an der Hemmfunktion ist dennoch nicht völlig auszuschließen.

VII. Klinische Bedeutung

Bei der rheumatoiden Arthritis wurden eine Verminderung der T-Lymphozyten im Blut (50,79,52), abgeschwächte Hautteste (22,74,76,31,1) und eine verminderte Antwort der Lymphozyten auf PHA-Stimulation beobachtet (76,36,38,64). KANTOR konnte im Tierversuch zeigen, daß die bei einer Virusinfektion zu beobachtende transitorische Anergie, die sich z.B. in einem Negativwerden des Tuberkulintestes während einer Maserninfektion äußert, an Serumfaktoren und nicht an zelluläre Elemente gebunden ist (32). Ob diese Serumfaktoren, für deren Vorkommen bei rheumatoider Arthritis wir in der vorliegenden Arbeit Anhalte lieferten, die Ursache oder ein Begleitphänomen der obengenannten Funktionsstörungen der Lymphozyten sind, läßt sich noch nicht sagen. Ihr Fortbestehen im Verlauf einer Virusinfektion scheint mit der Persistenz des Antigens einherzugehen (32) und könnte insofern ein Hinweis auf die Ätiologie einer Erkrankung, möglicherweise kombiniert mit einer Immunregulationsstörung,sein.

Die Stärke des Hemmfators korrelierte nach den vorliegenden Untersuchungen nicht mit der entzündlichen Aktivität, dagegen

mit dem klinischen Verlauf, so daß diesen immunsuppressiven Faktoren eine prognostische Bedeutung zukommt.

Neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung der PCP gehen ebenfalls von der Vorstellung einer Immunregulationsstörung aus. Folgerichtig wird versucht, z.B. mit Tetraimidazol (Levamisol) die Aktivität der T-Lymphozyten zu stimulieren (28). Damit ergibt sich eventuell die Möglichkeit, zur Wirkung dieser, aber auch anderer Therapieformen mit Hilfe der Hemmfaktorbestimmung eine Aussage zu machen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die direkte und indirekte Modifikation des Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Testes in der Agarplattentechnik nach CLAUSEN wurde durch Testung mit Tuberkulin als Antigen erneut als ein in-vitro-Korrelat der zellvermittelten Immunität bestätigt. In einem Vorversuch konnte eine unspezifische Migrationshemmung durch Immunkomplexe ausgeschlossen werden, dagegen bewirkten die im Antigen-Überschuß gelösten Immunkomplexe eine Migrationsstimulation.

Mit Hilfe des direkten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Testes konnte bei der primär-chronischen Polyarthritis eine zellvermittelte Immunität gegenüber aggregiertem Immunglobulin und heterologem Synovialextrakt nicht nachgewiesen werden. Auch der Versuch, bereits gebildeten Leukozyten-Inhibitions-Faktor (LIF) im Serum oder in der Synovialflüssigkeit dieser Patienten nachzuweisen, war ohne Erfolg.

Die Seren von 12 Patienten mit rheumatoider Arthritis hatten einen hemmenden Einfluß auf die Tuberkulin-induzierte spezifische Migrationsinhibition, d.h. die Migrationshemmung wurde in Gegenwart der Seren teilweise oder ganz aufgehoben. Dagegen zeigten die Gelenkergüsse derselben Patienten diese Wirkung nicht. Die Tatsache, daß der im indirekten Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test gewonnene LIF in seiner Wirkung durch diese Seren nicht beeinflußt wurde, läßt vermuten, daß dieser "Migrations-Inhibitions-Hemmfaktor" die LIF-Synthese beeinflußt.

Eine suppressive Wirkung auf die Teilung normaler, PHA-stimulierter Lymphozyten wurde auch mit den Seren von 31 Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet, während die Synovialflüssigkeiten die Stimulierbarkeit nicht beeinflußten. Eine besonders starke Hemmung wurde vor allem bei den Patienten mit einem progredienten Krankheitsverlauf beobachtet, nämlich in 7 von 10 Fällen, so daß dem Nachweis dieser Faktoren möglicherweise eine prognostische Bedeutung zukommt.

Diejenigen Seren, die die Lymphozytentransformation maximal unterdrückten, führten auch zu einer weitgehenden Aufhebung der Migrations-Inhibition, d.h., beide Faktoren korrelierten weitgehend, so daß vermutet werden muß, daß beide Phänomene durch denselben Faktor verursacht sind. Über den Ursprung, die chemische Natur und die Bedeutung dieser Faktoren im Ablauf der Immunantwort ist noch wenig bekannt, doch scheint ihre Persistenz im Verlauf einer Infektion Ausdruck einer Immunregulationsstörung zu sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Andrianakos A.A., Sharp J.T., Person D.A., Lidsky M.D., Duffy J.: Cell-mediated immunity in rheumatoid arthritis. Ann.Rheum.Dis. 36 : 13-20 (1977)

2) Astorga G.P., Williams R.C.Jr.: Altered reactivity in mixed lymphocyte culture of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 12 : 547-554 (1969)

3) Ax W., Tautz C.: Assay of leucocyte migration inhibition under agarose. Behring Inst.Mitt. 54 : 72-80 (1974)

4) Bacon P.A., Cracchiolo A., Bluestone R., Goldberg L.S.: Cell-mediated immunity to synovial antigens in rheumatoid arthritis. Lancet 1973 II : 699-702

5) Blank I.: Untersuchungen über den Einfluß von Immunkomplexen auf die In-vitro-Migration von Blutgranulozyten des Menschen. Allergie Immunol. 23 : 313-321 (1977)

6) Bloch-Michel H., Benoist M., Fine J.-M., Canetti P.: Un cas de polyarthrite chronique évolutive au cours de l'agammaglobulinémie. Rev.Rhum. 29 : 173-179 (1962)

7) Brattig N.: Über die Bedeutung immunsuppressiver Serumfaktoren bei akuter und chronischer Virushepatitis. Inauguraldissertation, Tübingen 1978 (im Druck)

8) Brattig N., Berg P.A.: Serum inhibitory factors (SIF) in patients with acute and chronic hepatitis and their clinical significance. Clin.exp.Immunol. 25 : 40-49 (1976)

9) Brenner A.I., Scheinberg M.A., Cathcart E.S.: Surface characteristics of synovial fluid and peripheral blood

lymphocytes in inflammatory arthritis.
Arthritis Rheum. 18 : 297-303 (1975)

10) Brostoff J., Howell A., Roitt I.M.: Leucocyte migration inhibition with aggregated gamma globulin in patients with rheumatoid arthritis.
Clin.exp.Immunol. 15 : 1-7 (1973)

11) Cabanel G., Voog R., Stefani D., Groslambert P., Marchal A.: Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte révélatrice d'une agammaglobulinémie.
Sem.Hôp.Paris 45 : 3034-3039 (1969)

12) Cantor H., Weissman I.: Development and function of subpopulations of thymocytes and t-lymphocytes.
Progr.Allergy 20 : 1-64 (1976)

13) Caperton E.M.Jr., Baker D.R., King R.A.: Lymphocyte reactivity in rheumatoid arthritis.
Ann.Rheum.Dis. 34 : 231-234 (1975)

14) Chaparas S.D., Thor D.E., Godfrey H.P., Baer H., Hedrick S.R.: Tuberculin-active carbohydrate that induces inhibition of macrophage migration but not lymphocyte transformation.
Science 170 : 637-639 (1970)

15) Clausen J.E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium.
Acta Allergol. 26 : 56-80 (1971)

16) Clausen J.E.: Migration inhibitory effect of cell-free supernatants from tuberculin-stimulated cultures of human mononuclear leukocytes demonstrated by two-step MIF agarose assay.
J.Immunol. 110 : 546-551 (1973)

17) Cooperband S.R., Bondevik H., Schmid K., Mannick J.A.: Transformation of human lymphocytes: inhibition by homologous alpha globulin.
Science 159 : 1243-1244 (1968)

18) Cooperband S.R., Badger A.M., Davis R.C., Schmid K., Mannick J.A.: The effect of immunoregulatory alpha globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. J.Immunol. 109 : 154-163 (1972)

19) Davis R.C., Cooperband S.R., Mannick J.A.: The effect of immunoregulatory alpha globulin (IRA) on antigen-mediated macrophage immobilization in vitro. J.Immunol. 106 : 755-760 (1971)

20) Denman A.M.: Die Ätiologie der chronischen Polyarthritis. Immunität Infekt. 4 : 37-51 (1976)

21) Dorner R.W., Gantner G.E., Goldschmidt J., Zuckner J., Fudenberg H.H.: Stimulation of lymphocyte transformation by autologous serum fractions from patients with rheumatoid arthritis. Immunology 27 : 781-793 (1974)

22) Epstein W.L., Jessar R.A.: Contact-type delayed hypersensitivity in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2 : 178-181 (1959)

23) Fröland S.S., Gaarder P.I.: The effect of IgG in vitro on leukocytes from patients with rheumatoid arthritis. Scand.J.Immunol. 2 : 385-393 (1973)

24) Good R.A., Rötstein J., Mazzitello W.F.: The simultaneous occurence of rheumatoid arthritis and agammaglobulinemia. J.Lab.Clin.Med. 49 : 343-357 (1957)

25) Hedberg H., Källen B., Low B., Nillson O.: Impaired mixed leukocyte reaction in some different diseases, notably multiple sclerosis and various arthritides. Clin.exp.Immunol. 9 : 201-207 (1971)

26) Heidelberger M., Kendall F.E.: Continued quantitative theory of precipitin reaction: reaction between crystalline egg albumin and its homologous antibody. J.Exp.Med. 62 : 697-708 (1935)

27) Humphrey G.B., Lankford J., Oleinick S., Nitschke R.: Leukemic serum inhibition of phytohemagglutinin-induced transformation.
J.Immunol. 113 : 63-69 (1974)

28) Huskisson E.C., Dieppe P.A., Scott J., Trapnell J., Balme H.W., Willoughby D.A.: Immunostimulant therapy with levamisole for rheumatoid arthritis.
Lancet 1976 I : 393-395

29) Janossy G., Greaves M.F.: Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogenes.
Clin.exp.Immunol. 9 : 483-498 (1971)

30) Kacaki J.N., Bullock W.E., Vaughan J.H.: Failure of lymphocyte transformation in response to gamma-globulins in rheumatoid arthritis.
Lancet 1969 I : 1289-1290

31) Kacaki J., Budumir M., Berovic Z.: Screening of cellular immunity in patients with rheumatoid arthritis by phytohaemagglutinin skin test.
Rheumatology 6 : 72-79 (1975)

32) Kantor F.S.: Infection, anergie and cell-mediated immunity.
New Engl.J.Med. 292 : 629-634 (1975)

33) Keith H.I., Currey H.L.F.: Rosette formation by peripheral blood lymphocytes in rheumatoid arthritis.
Ann.Rheum.Dis. 32 : 202-207 (1973)

34) Keystone E.C., Gladman D.D., Urowitz M.B., Clarke D.A., Falk J.A., Osoba D., Gordon D.A.: Mixed leukocyte reaction in rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. 19 : 532-538 (1976)

35) Knowles M., Hughes D., Caspary E.A., Field E.J.: Lymphocyte transformation in multiple sclerosis.
Lancet 1968 II : 1207-1209

36) Lance E.M., Knight S.C.: Immunologic reactivity in rheumatoid arthritis. Response to mitogens.

Arthritis Rheum. 17 : 513-520 (1974)

37) Levene G.M., Turk J.L., Wright D.J.M., Grimble A.G.S.: Reduced lymphocyte transformation due to a plasma factor in patients with active syphilis. Lancet 1969 II : 246-247

38) Lockshin M.D., Eisenhauer A.C., Kohn R., Weksler M., Block S., Mushlin S.B.: Cell-mediated immunity in rheumatic diseases. II. Mitogen response in RA, SLE, and other illnesses: Correlation with T- and B-lymphocyte populations. Arthritis Rheum. 18 : 245-250 (1975)

39) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193 : 265-275 (1951)

40) Macsween R.N.M., Thomas M.A.: Lymphocyte transformation by phytohaemagglutinin (PHA) and purified protein derivative (ppd) in primary biliary cirrhosis. Evidence of serum inhibitory factors. Clin.exp.Immunol. 15 : 523-533 (1973)

41) McFarlin D.E., Oppenheim J.J.: Impaired lymphocyte transformation in ataxia-telangiectasia in part due to a plasma inhibitory factor. J.Immunol. 103 : 1212-1222 (1969)

42) Menzoian J.O., Glasgow A.H., Nimberg R.D., Cooperband S.R., Schmid K., Saporoschetz I., Mannick J.A.: Regulation of T lymphocyte function by immunoregulatory alphaglobulin (IRA). J.Immunol. 113 : 266-273 (1974)

43) Micheli A., Bron J.: Studies on blood T and B lymphocytes in rheumatoid arthritis. Ann.Rheum.Dis. 33 : 435-436 (1974)

44) Mortensen R.F., Braun D., Gewurz H.: Effects of C-reactive protein on lymphocyte functions. III. Inhibition of antigen-induced lymphocyte stimulation and lymphokine

production.
Cell.Immunol. 28 : 59-68 (1977)

45) Mudra I., Stelzner A., Schnabel I., Jäger L., Kittlick M.: Untersuchungen mit dem Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Test bei Patienten mit Rheumatoid-Arthritis.
Allergie Immunol. 22 : 159-165 (1976)

46) Nelson D.S., Penrose J.M.: Macromolecular inhibitor of lymphocyte transformation in serum from patients with chronic renal failure.
Austr.J.exp.Biol.med.Sc. 51:259-262 (1973)

47) Opelz G., Terasaki P.I., Hirata A.A.: Suppression of lymphocyte transformation by aspirin.
Lancet 1973 II : 478-480

48) Otto W., Astapenko M.G., Fischer H., Häntzschel H.: Überprüfung von Kriterien zur Aktivitätsdiagnostik bei Patienten mit progressiv chronischer Polyarthritis.
Zschr.inn.Med. 29 : 21-24 (1974)

49) Panush R.S.: Effects of certain antirheumatic drugs on normal human peripheral blood lymphocytes.
Arthritis Rheum. 19 : 907-917 (1976)

50) Papamichail M., Brown J.C., Holborow E.J.: Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes.
Lancet 1971 II : 850-852

51) Penhale W.J., Farmer A., Maccuish A.C., Irvine W.J.: A rapid micro-method for the phytohaemagglutinin-induced human lymphocyte transformation test.
Clin.exp.Immunol. 18 : 155-167 (1974)

52) Popovic M., Munro J., Davies P., Holt P.J.L.: Lymphocyte subpopulations in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.
Ann.Rheum.Dis. 33 : 407-408 (1974)

53) Rawson A.J., Huang T.C.: Lymphocytes in rheumatoid arthritis. I. Responses to allogenic cells and to phytomitogens.
Clin.exp.Immunol. 16 : 41-46 (1974)

54) Rocklin R.R.: Products of activated lymphocytes: leukocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF).
J.Immunol. 112 : 1461-1466 (1974)

55) Roitt I.M., Doniach D.: Immunfuorescent tests for the detection of autoantibodies.
WHO Manuel for immunological techniques. Genf 1969

56) Ropes M.W., Bennett G.A., Cobb S., Jacox R., Jessar R.: 1958 version of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. 2 : 16-20 (1959)

57) Rosenthal M., Graf U., Müller W.: Nachweis und Vorkommen von Immunkomplexen bei rheumatischen Erkrankungen.
Schweiz.med.Wschr. 106 : 1116-1121 (1976)

58) Rothenberger W.: Celluläre Immunreaktionen gegen aggregiertes Human-Gamma-Globulin bei der primär-chronischen Polyarthritis.
Klin.Wschr. 50 : 1019-1021 (1972)

59) Rothenberger W., Thiele H.G.: In vitro-Studie zur Pathogenese der primär chronischen Polyarthritis mittels des Lymphocytentransformationstests.
Klin.Wschr. 48 : 518-521 (1970)

60) Rothenberger W., Thiele H.G.: In vitro-Studie zur Pathogenese der primär-chronischen Polyarthritis mittels des Migrations-Inhibitionstests.
Klin.Wschr. 48 : 1308-1311 (1970)

61) Runge L.A., Mills J.A.: In vivo and in vitro response to autologous IgG in patients with rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. 14 : 631-638 (1971)

62) Scheiffarth F., Warnatz H.: Lymphozytentransformationstest. Eine neue Methode in der Diagnostik der primär chronischen Polyarthritis.
Med.Klin. 63 : 1808-1810 (1968)

63) Sheldon P.J., Papamichail M., Holborow E.J.: Studies on synovial fluid lymphocytes in rheumatoid arthritis. Ann.Rheum.Dis. 33 : 509-514 (1974)

64) Silverman H.A., Johnson J.S., Vaughan J.H., McGlamory J.: Altered lymphocyte reactivity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 19 : 509-515 (1976)

65) Söborg M., Bendixen G.: Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. Acta Med.Scand. 181/2 : 247-256 (1967)

66) Spitler L., Huber H., Fudenberg H.H.: Inhibition of capillary migration by antigen-antibody complexes. J.Immunol. 102 : 404-411 (1969)

67) Stastny P., Cooke T.D., Ziff M.: Production of a macrophage migration inhibitory factor in rabbits with experimental arthritis. Clin.exp.Immunol. 14 : 141-147 (1973)

68) Stastny P., Rosenthal M., Andreis M., Ziff M.: Lymphokines in the rheumatoid joint. Arthritis Rheum. 18 : 237-243 (1975)

69) Steinbrocker O., Traeger C.H., Battermann C.R.: Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. J.Am.Med.Assoc. 140 : 659-664 (1949)

70) Stiehl P., Eberhardt M., Eberhardt C.: Die Beeinflussung der Leukozytenmigration durch Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoidarthritis. Allergie Immunol. 22 : 79-82 (1976)

71) Stimson W.H.: Studies on the immunsuppressive properties of a pregnancy-associated alpha-macroglobulin. Clin.exp.Immunol. 25 : 199-206 (1976)

72) Suciu-Foca N., Buda J., McManus J., Thiem T., Reemtsma K.: Impaired responsiveness of lymphocytes and serum-inhibitory factors in patients with cancer. Cancer Res. 33 : 2373-2377 (1973)

73) Thonar E.J.-M.A., Sweet M.B.E.: Cellular hypersensitivity in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and anterior nongranulomatous uveitis.
Arthritis Rheum. 19 : 539-544 (1976)

74) Toh B.H., Roberts-Thomson I.C., Mathews J.D., Whittingham S. Mackay I.R.: Depression of cell-mediated immunity in old age and the immunopathic diseases, lupus erythematosus, chronic hepatitis and rheumatoid arthritis.
Clin.exp.Immunol. 14 : 193-202 (1973)

75) Utsinger P.D.: Synovial fluid lymphocytes in rheumatoid arthritis
Arthritis Rheum. 18 : 595-602 (1975)

76) Waxman J., Lockshin M.D., Schnapp J.J., Doneson I.N.: Cellular immunity in rheumatic diseases. I. Rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum. 16 : 499-506 (1973)

77) Whittaker M.G., Rees K., Clark C.G.: Reduced lymphocyte transformation in breast cancer.
Lancet 1971 II : 892-893

78) Williams R.C.Jr., Lies R.B., Messner R.P.: Inhibition of mixed leukocyte culture responses by serum and gamma-globulin fractions from certain patients with connective tissue disorders.
Arthritis Rheum. 16 : 597-605 (1973)

79) Williams R.C.Jr., DeBoard J.R., Mellbye O.J., Messner R.P., Lindström F.D.: Studies of T- and B-lymphocytes in patients with connective tissue diseases.
J.Clin.Invest. 52 : 283-295 (1973)

80) Zitnan D., Rovensky J., Svejcar J., Pekarek J., Cebecauer L.: Inhibition der Makrophagenmigration mit IgG-sensibilisierten Lymphozyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis.
Allergie Immunol. 20/21 : 67-70 (1974/1975)

81) Zvaifler N.J.: The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis.
Adv.Immunol. 16 : 265-336 (1973)

Lebenslauf

Am 23. April 1950 wurde ich, Andreas Lohrmann, als Sohn des Versicherungskaufmanns Eberhard Lohrmann und seiner Frau Gunda, geb. Drößler in Kirchheim/Teck geboren. Nach der Grundschule besuchte ich das Schloß-Gymnasium in Kirchheim/Teck, wo ich im Juni 1969 die Reifeprüfung bestand. 2 Jahre Wehrdienst folgten. Nach einem Semester Biologie begann ich im Sommersemester 1972 an der Universität Tübingen mit dem Medizinstudium. Nach Absolvierung des "Praktischen Jahres" am Kreiskrankenhaus Böblingen legte ich am 18. Oktober 1978 in Tübingen das medizinische Staatsexamen ab.